

UFRRJ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

TESE

**Estudo histológico e localização imuno-histoquímica de  
proteínas do citoesqueleto em ovários, testículos e  
epidídimos de três espécies de lagartos da Família  
Leiosauridae (Reptilia: Squamata)**

ENELY MARIS DA SILVEIRA FIRMIANO

Seropédica - Rio de Janeiro

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ESTUDO HISTOLÓGICO E LOCALIZAÇÃO  
IMUNO-HISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DO  
CITOESQUELETO EM OVÁRIOS, TESTÍCULOS E  
EPIDÍDIMOS DE TRÊS ESPÉCIES DE LAGARTOS DA  
FAMÍLIA LEIOSAURIDAE (REPTILIA: SQUAMATA)**

ENELY MARIS DA SILVEIRA FIRMIANO

*Sob a orientação da Professora*

**Dra. Nadja Lima Pinheiro**

*coorientação da Professora*

**Dra. Aparecida Alves do Nascimento**

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Ciências**, no  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal.

Seropédica, RJ  
Agosto, 2017.

## FICHA CATALOGRÁFICA

F524e Firmiano, Enely Maris da Silveira, 1986-  
Estudo histológico e localização imuno-histoquímica de proteínas do citoesqueleto em ovários, testículos e epidídimos de três espécies de lagartos da Família Leiosauridae (Reptilia:Squamata) / Enely Maris da Silveira Firmiano. - 2017.  
111 f.: il.

Orientadora: Nadja Lima Pinheiro.  
Coorientadora: Aparecida Alves do Nascimento.  
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Biologia Animal, 2017.

1. Imunorreação. 2. Morfologia. 3. Squamatas. 4. Sistema reprodutor. I. Pinheiro, Nadja Lima, 1943-, orient. II. do Nascimento, Aparecida Alves, 1973-, coorient. III. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Biologia Animal. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

ENELY MARIS DA SILVEIRA FIRMIANO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal.

TESE APROVADA EM 29/08/2017

---

Dra. Nadja Lima Pinheiro  
(Orientadora)

---

Dr. Marcos Antônio José dos Santos – UFRRJ

---

Dra. Rosa Maria Marcos Mendes - UFRRJ

---

Dra. Clarice Machado dos Santos - UFF

---

Dr. Severo de Paoli – Estácio de Sá/ Policlínica Geral do RJ



Dedico esta tese em especial ao meu alicerce de toda uma vida,  
à minha **Tia Salete**, sem a qual nada disso seria possível!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, que com sua infinita bondade, sempre guiou meus passos, levando-me sempre ao melhor caminho. Que nunca me deixou desistir, apesar de todos os percalços desta longa jornada.

A minha orientadora, Professora Dra. Nadja Lima Pinheiro pelo auxílio e apoio na construção deste trabalho.

A minha coorientadora, professora Dra. Aparecida Alves do Nascimento por não apenas incentivar e ajudar a esclarecer os principais questionamentos e dúvidas surgidos durante esta tese, como também pela parceria de alguns bons anos.

A Área de Histologia e Embriologia da UFRRJ, por ter me propiciado condições para execução deste e de outros trabalhos, além de todo o aprendizado e convívio durante estes longos anos que estive com vocês.

A equipe do laboratório de Histopatologia da UFRRJ pela preciosa colaboração na imunohistoquímica.

A técnica de laboratório mais amiga do mundo, Ilza Lucas, por toda a amizade, carinho, alegrias, horas de desabafos e conselhos, além de confeccionar o melhor material para estudo histológico, que foi de extrema valia neste e em outros trabalhos realizados.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por toda ajuda durante o Mestrado e Doutorado e ao coordenador do Programa Professor Dr. Francisco Gerson de Araújo.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A pessoa mais especial, tia Salete, que sempre me amparou nos momentos mais difíceis, se abdicando de sua própria vida, em troca de realizar meus sonhos e anseios. Com certeza, sem ela minha vida teria seguido por outros caminhos.

Ao meu marido Ricardo, por todo o amor, carinho e compreensão, sempre me incentivando a continuar. Por ter compreendido os diversos momentos de ausência, estresse e muita apreensão durante meus estudos.

Aos queridos amigos ruralinos, que há um bom tempo pactuam deste sonho maluco de Biólogos: Vinicius, Taynara, Luiz e Dani. Vocês, de longe ou perto, foram muito importantes para a conclusão de mais este ciclo.

A amiga-irmã, Nathália das Neves Cardoso, um presente que Deus reservou para mim, desde que larguei minha casa pra vir estudar em Seropédica. Seu incentivo e amizade são responsáveis por grande parte da força que tive para chegar até aqui.

As amigas do eterno quarto 308, obrigada pela amizade mantida durante todos esses anos. Foram inúmeros momentos compartilhados que nos fizeram amadurecer juntas.

Aos amigos de minha cidade, pelo apoio, carinho e por suportarem a ausência devido às horas dedicadas a este trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Obrigada!

## Resumo

FIRMIANO, Enely Maris da Silveira. **Estudo Histológico e localização imuno-histoquímica de proteínas do citoesqueleto em ovários, testículos e epidídimos de três espécies de lagartos da Família Leiosauridae (Reptilia: Squamata)**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Este trabalho investiga, além da descrição histológica e histoquímica, a presença e distribuição imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina nos ovários, testículos e epidídimos de *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* e *Urostrophus vautieri*, representantes da família Leiosauridae, para ajudar a formar uma base de dados sobre a biologia reprodutiva destes lagartos que possam ser comparados com outras espécies de répteis, bem como com outros vertebrados. Os espécimes estudados encontram-se depositados na Coleção Herpetológica da UFJRJ. Os ovários, epidídimos e testículos dos animais foram removidos e encaminhados ao Laboratório de Histologia e Embriologia (UFRRJ), onde foram fixados, processados e então submetidos às técnicas histológicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas. Os ovários destes leiosaurídeos são órgãos pareados, repletos de folículos ovarianos, em distintos estágios de desenvolvimento folicular. Estes são revestidos por epitélio cúbico simples, com uma camada de tecido conjuntivo subjacente, a túnica albugínea. Os testículos encontram-se envolvidos pela túnica albugínea e em seu interior contém septos que formam lóbulos, nos quais se localizam os túbulos seminíferos. Os epidídimos destes lagartos são ductos convolutos, revestidos internamente por um epitélio que varia de cilíndrico simples a cúbico simples com estereocílios. A imuno-histoquímica, nos ovários dos lagartos estudados, mostra uma reação moderada a acentuada para alfa-actina de músculo liso na camada da teca e em células endoteliais dos vasos sanguíneos, enquanto nos testículos destas espécies nota-se uma acentuada reação para esta proteína do citoesqueleto, na túnica albugínea, no tecido intersticial e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. Nos epidídimos observa-se imunomarcagem para alfa-actina na cápsula e no tecido intersticial destes lagartos. Quanto ao anticorpo desmina, apenas em *E. perditus*, foi possível imunorreação na albugínea e no estroma ovariano, no entanto, nas três espécies analisadas, as células endoteliais dos vasos sanguíneos demonstraram reação positiva a este filamento intermediário. Nos testículos dos leiosaurídeos estudados, a desmina foi imunolocalizada na albugínea testicular e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, entretanto, apenas em *E. bilineatus* ocorreu imunomarcagem, na região do interstício. Nos epidídimos, a desmina demonstrou imunorreação positiva apenas em *E. perditus* e *E. bilineatus*. Não houve reação imuno-histoquímica para vimentina nos ovários, testículos e epidídimos dos três lagartos analisados. Este estudo obteve resultados consistentes, fornecendo assim mais dados sobre a biologia reprodutiva das espécies aqui investigadas, que poderão ser utilizados para comparações filogenéticas e comportamentais com outras espécies da família Leiosauridae e outros répteis.

**Palavras Chave:** Imunorreação, morfologia, Squamatas, sistema reprodutor.

## ABSTRACT

FIRMIANO, Enely Maris da Silveira. **Histological study and localization immunohistochemical of cytoskeleton proteins in testes and epididymis of three lizard species belonging to family Leiosauridae (Reptilia: Squamata)**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The aim of the current study is to investigate the histological and histochemical description, as well as the presence and immunohistochemical distribution of cytoskeleton proteins such as alpha smooth muscle actin, desmin and vimentin in the ovaries, testes and epididymis of *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* and *Urostrophus vautieri*. These species are representatives of family Leiosauridae, in order to help developing a database on the reproductive biology of these lizards, which could be compared to that of other reptile species and vertebrates. The herein studied specimens are deposited in the Herpetological Collection of Federal University of Juiz de Fora. The animals' ovaries, epididymis and testes were removed and sent to the Histology and Embryology Laboratory (UFRRJ), where they were fixed, processed and then subjected to histological, histochemical and immunohistochemical techniques. The ovaries of these leiosauridae are functionally-active paired organs filled with ovarian follicles at different follicular development stages. These organs are covered by a simple cubic epithelium, which presents an underlying connective tissue layer called tunica albuginea. The testes are covered by the tunica albuginea and hold septa forming lobes where the seminiferous tubules are located in. The epididymis of these lizards are convolute ducts internally coated by an epithelium, whose shape ranges from simple cylindrical to simple cubic with stereocilia. The immunohistochemical analysis applied to the ovaries of the herein studied lizards showed moderate to strong reaction to the alpha smooth muscle actin in the teak layer and in endothelial cells of blood vessels. With respect to the species' testes, this cytoskeleton protein showed strong reaction in the tunica albuginea, interstitial tissue, and in endothelial cells of blood vessels. As for the epididymis, the alpha-actin showed immunohistochemical reaction in the capsule and in the interstitial tissue of the lizards. The antibody 'desmin' showed strong immunostaining in the albuginea and ovarian stroma of *E. perditus*, only; however, the endothelial cells in the blood vessels of the three herein analyzed species showed positive reaction to this intermediate filament. Desmin showed immunoreactivity in the testicular albuginea and in the endothelial cells of the blood vessels in the herein analyzed leiosauridae testes; however, only *E. bilineatus* showed immunostaining in the interstitial region. Desmin showed positive immunoreaction in the epididymis of *E. perditus* and *E. bilineatus*, only. Vimentin did not show immunostaining in the ovaries, testes and epididymis of the three analyzed lizards. The consistent results found in the current study provide additional data on the reproductive biology of the investigated species. These data may be used for phylogenetic and behavioral comparisons between the herein studied species and other species belonging to family Leiosauridae or other reptiles.

**Keywords:** Immunoreactivity, morphology, Squamates, reproductive system.

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Animais utilizados no estudo com número de tombo e local de coleta.	<b>26</b>
<b>Tabela 2</b> - Tabela com os detalhes sobre os anticorpos primários utilizados neste estudo.	<b>29</b>
<b>Tabela 3</b> - Intensidade relativa da imunolocalização nos ovários dos leiosaurídeos investigados.	<b>48</b>
<b>Tabela 4</b> - Intensidade relativa da imunolocalização nos testículos e epidídimos dos leiosaurídeos investigados.	<b>76</b>

## **LISTA DE ESQUEMAS**

<b>Esquema 01</b> - Ilustração adaptada sobre os elementos do citoesqueleto.	<b>22</b>
<b>Esquema 02</b> - Representação de órgãos do sistema urogenital feminino de lagartos.	<b>35</b>
<b>Esquema 03</b> - Ilustração adaptada sobre os constituintes da parede de um folículo vitelogênico.	<b>38</b>
<b>Esquema 04</b> - Representação de órgãos do sistema urogenital masculino de lagartos.	<b>65</b>
<b>Esquema 05</b> - Representação de uma seção transversal através de um túbulo seminífero em testículo de réptil feito por Zug <i>et al.</i> (2001).	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** **A)** *Enyalius bilineatus*; **B)** *Enyalius perditus*; **C)** *Urostrophus vautieri*. 20  
Fontes: a: Foto de V. D. Fernandes b: Foto de L. M. C. Lima c: Foto de Rodrigo C. Santos.
- Figura 2:** **A)** Exemplar utilizado da espécie *Urostrophus vautieri*. **B)** Exemplar utilizado da espécie *Enyalius perditus*. **C)** Exemplar utilizado da espécie *Enyalius bilineatus*. 28
- Figura 3:** **A)** Aparelho reprodutor feminino de *Urostrophus vautieri*. **B)** Aparelho reprodutor feminino de *Enyalius perditus*. **C)** Aparelho reprodutor feminino de *Enyalius bilineatus*. 36
- Figura 4:** **A.** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus*. Folículos ovarianos pré-vitelogênicos (fp) na região cortical, (N) núcleo do ovócito e vaso sanguíneo (v) na região medular. (HE). Aumento de 150x. **B.** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Folículos ovarianos em distintos estágios de maturação e núcleo em posição excêntrica (N). Folículos pré-vitelogênicos (fp) e folículos vitelogênicos (fv). (HE). Aumento de 300x. 37
- Figura 5:** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Visão geral dos folículos ovarianos. Camada da teca (T), camada da granulosa (G), zona pelúcida (Z) e vasos sanguíneos (v). (HE). Aumento de 630x. 40
- Figura 6:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Aumento de 630x. (PAS). **B)** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus*. Aumento de 150x. (PAS). **C)** Fotomicrografia do ovário de *U. vautieri*. Aumento de 630x. (PAS). Camada da granulosa (G), zona pelúcida (Z) e vasos sanguíneos (V). 41
- Figura 7:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. (AB). Aumento de 630x. **B)** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus*. Aumento de 630x. (AB). Camada da teca (T), camada da granulosa (G), zona pelúcida (Z) e vasos sanguíneos (V). 42
- Figura 8:** **A)** Fotomicrografia do folículo ovariano de *E. bilineatus*. **B)** Fotomicrografias do folículo ovariano de *E. perditus*. Visão geral dos três tipos celulares da camada granulosa: células pequenas (→), células intermediárias (I) e células grandes (▲). Teca (T), granulosa (G), zona pelúcida (Z→) e vasos sanguíneos (v). (HE). Aumento de 1150x. 43
- Figura 9:** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Visão geral de um folículo ovariano pré-vitelogênico. Camada granulosa (G) e o citoplasma repleto de grânulos de vitelo (C). Fibras colágenas da camada teca coradas em azul (T), vasos sanguíneos (V), zona pelúcida (↑). (Tricrômico de Mallory). Aumento de 630x. 44
- Figura 10:** **A)** Fotomicrografia do folículo ovariano vitelogênico de *E. perditus*. (HE). Aumento de 630x. **B)** Fotomicrografia do folículo ovariano vitelogênico de 45

*U. vautieri*. Camada da teca abundante em fibras colágenas. Aumento de 1150x. (Tricrômico de Mallory). Camada teca (T), Camada da granulosa (G), zona pelúcida (Z→), vasos sanguíneos (V) e grânulos de vitelo (gv).

**Figura 11:** **A)** Controle positivo para alfa-actina de músculo liso - células endoteliais de vasos sanguíneos. Aumento de 300x. **B)** Controle positivo para desmina - Músculo estriado esquelético e músculo liso na túnica média da artéria muscular. Aumento de 300x. **C)** Controle positivo para vimentina. Aumento de 630x. 47

**Figura 12:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus* com imunorreação para alfa-actina na região da teca. Observe que a zona pelúcida e a granulosa reagiram negativamente. Aumento de 630x. (T) camada Teca, (G) camada granulosa e (↑) zona pelúcida. **B)** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus*. Note a reação imuno-histoquímica nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. (↑) endotélio dos vasos sanguíneos. Aumento de 630x. 49

**Figura 13:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Em destaque, a reação imuno-histoquímica para alfa-actina na região da teca no folículo ovariano. Note que a zona pelúcida e a camada granulosa não reagiram para este anticorpo. (T) camada teca, (↑) granulosa e (▲) zona pelúcida. Aumento de 630x. **B)** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Em evidência a imunomarcagem para alfa-actina na teca e no endotélio dos vasos sanguíneos. (▲) endotélio dos vasos sanguíneos, (T) Teca e (G) granulosa. Aumento de 630x. 50

**Figura 14:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *U. vautieri* evidenciando a reação imuno-histoquímica para alfa-actina em filamentos na região da teca, em um folículo ovariano. (↑) camada teca. Aumento de 630x. **B)** Fotomicrografia do ovário de *U. vautieri* mostrando a imunorreação para alfa-actina no endotélio dos vasos sanguíneos. (▲) endotélio dos vasos sanguíneos. Aumento de 1150x. 51

**Figura 15:** **A)** Fotomicrografia dos ovários de *E. perditus* evidenciando a imunomarcagem para o FI desmina nas fibras musculares. (G) granulosa, (T) teca, (→) zona pelúcida e (▼) fibras musculares. Aumento 630x. **B)** Fotomicrografia dos ovários de *E. bilineatus*. Notar a ausência de reação imuno-histoquímica para a desmina, nas fibras musculares, teca e granulosa. (▼) fibras musculares, (T) teca e (G) granulosa. Aumento 1150x. 52

**Figura 16:** Fotomicrografias dos ovários de **(A)** *E. bilineatus*, **(B)** *E. perditus* e **(C)** *U. vautieri*. Notar a reação imuno-histoquímica para a desmina nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. A) aumento de 1150x, B) e C) aumento de 630x. (G) camada granulosa, (T) teca, (→) zona pelúcida e (▼) endotélio vasos sanguíneos. 53

**Figura 17:** Fotomicrografias dos ovários de **(A)** *E. perditus*, **(B)** *E. bilineatus* e **(C)** *U. vautieri*. Destaque para ausência de reação imuno-histoquímica para o FI vimentina. (G) granulosa, (V) vasos sanguíneos, (T) teca e (▶) zona pelúcida. A) 54



Aumento de 300x. B) e C) Aumento de 630x.

**Figura 18:** Fotos do aparelho reprodutor masculino. A) de *Enyalius bilineatus*. B) de *Enyalius perditus*. C) de *Urostrophus vautieri*. 66

**Figura 19:** Fotomicrografia do testículo de *E. perditus*. Túnica albugínea (A) rica em fibras colágenas, evidenciadas pelo tricrômico de Mallory. Fibras dividem o órgão em lóbulos, delimitando os túbulos seminíferos (TS). Tecido intersticial evidenciando as células intersticiais (↓). (Tricrômico de Mallory). Aumento de 630x. 68

**Figura 20:** A) Fotomicrografia dos túbulos seminíferos de *E. perditus*, Em evidência a túnica albugínea (TA) e o tecido intersticial (TI) que reagiram moderadamente ao PAS e os túbulos seminíferos (TS). (PAS). Aumento de 300x. B) Fotomicrografia dos túbulos seminíferos de *E. bilineatus*. Túnica albugínea (A), as células do epitélio seminífero (ES) e o lúmen (L), ambos negativos ao AB. (AB). Aumento de 1150x. 69

**Figura 21:** A) Fotomicrografia dos túbulos seminíferos de *E. perditus*, Em evidência o lúmen (L), epitélio seminífero (ES), túnica própria (↓) e vasos sanguíneos (\*) (HE). Aumento de 630x. B) Fotomicrografia do ciclo do epitélio seminífero de *E. bilineatus*. Túnica albugínea (TA), epitélio seminífero (E). (HE). Aumento de 1150x. 70

**Figura 22:** Fotomicrografia do epidídimo de *E. bilineatus*. Secções da porção maior do ducto epididimário revestido internamente por epitélio cilíndrico simples (seta) e secções da porção menor do ducto epididimário revestido internamente por epitélio cúbico simples esterociliado (\*). (HE). Aumento de 630x. 71

**Figura 23:** A) Fotomicrografia do epidídimo de *E. perditus*. (Tricrômico de Mallory). Aumento de 300x. B) Fotomicrografia do epidídimo de *E. bilineatus*. (Tricrômico de Mallory). Aumento de 300x. Cápsula e septos de tecido conjuntivo (↗), espermatozoides (EZ) e epitélio epididimário (E). 72

**Figura 24:** A) Fotomicrografia do epidídimo de *E. bilineatus*. Cápsula (seta). Ducto epididimário revestido por epitélio simples cilíndrico (E) formado por células principais. No interior do ducto observa-se espermatozoides (Ez) e em torno da parede do ducto nota-se músculo liso e tecido conjuntivo (▶). (HE). Aumento de 630x. B) Fotomicrografia do epidídimo de *U. vautieri*. Ducto epididimário revestido por epitélio simples cilíndrico (E) formado por células principais com vesículas secretoras. (HE). Aumento de 630x. 74

**Figura 25:** A) Fotomicrografia do epidídimo de *E. perditus*. Células epiteliais (E) PAS negativa e tecido conjuntivo (↙) PAS positivo. Aumento de 300x. B) Fotomicrografia do epidídimo de *U. vautieri*. Células epiteliais (E) e tecido conjuntivo (↙) ambos AB negativo. Aumento de 1150x. Espermatozoides (Ez). 75

**Figura 26:** Fotomicrografias dos testículos de *E. bilineatus*. Em A, 77

imunolocalização positiva acentuada para alfa-actina na cápsula testicular (▼) e no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→). Aumento de 630x. Em **B**, imunolocalização positiva para alfa-actina no tecido intersticial. (TS) Túbulos seminíferos. Aumento de 630x.

**Figura 27:** Fotomicrografias dos testículos de *E. perditus*. **A)** Imunolocalização 78  
positiva para alfa-actina em filamentos da cápsula testicular (▼) e no tecido intersticial (→). (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 1150x. **B)** Imunolocalização para alfa-actina no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→). (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 630x.

**Figura 28:** Fotomicrografias dos testículos de *U. vautieri*. Em **A**, 79  
imunolocalização positiva para alfa-actina na cápsula testicular (▼) e no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→). Aumento de 1150x. Em **B**, imunolocalização positiva para alfa-actina em filamentos da cápsula testicular (▼) e no tecido intersticial (→) (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 630x.

**Figura 29:** **A)** Fotomicrografia do testículo de *E. bilineatus*. Imunolocalização 80  
positiva para alfa-actina nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (▶). Aumento de 630x. **B)** Fotomicrografia do testículo de *E. perditus*. Imunolocalização positiva para alfa-actina nos vasos sanguíneos (▶). Aumento de 630x. (TS) túbulos seminíferos. (→) cápsula testicular.

**Figura 30:** Fotomicrografias do testículo de *E. bilineatus*. Em **A**, 81  
imunolocalização positiva para desmina na albugínea testicular (▼) e no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→). Aumento de 630x. Em **B**, imunolocalização positiva para desmina no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→). (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 300x.

**Figura 31:** Fotomicrografias do testículo de *E. perditus*. Em **A**, Imunolocalização 82  
positiva moderada para desmina na albugínea testicular (▼) e reação negativa no tecido intersticial (→). Aumento de 630x. **B)** Imunolocalização para desmina nos vasos sanguíneos (▷) no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos. Aumento de 1150x. (TS) túbulos seminíferos.

**Figura 32:** Fotomicrografias do testículo de *U. vautieri*. Em **A**, Imunolocalização 83  
positiva moderada para desmina na albugínea testicular (▼), acentuada nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (▷) e negativa no tecido intersticial (→) Aumento de 630x. **B)** Imunolocalização positiva acentuada para desmina no endotélio dos vasos sanguíneos (▷) e ausente no tecido intersticial (→). (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 630x.

**Figura 33:** Fotomicrografia do epidídimo de *E. perditus*. Imunolocalização 84  
positiva para alfa-actina na cápsula e no tecido conjuntivo intersticial entre as secções do ducto epididimário (▼). (D) ducto do epidídimo. Aumento de 630x.

## SUMÁRIO

<b>Introdução</b>	<b>16</b>
Revisão de Literatura	18
Objetivos	25
Materiais e Métodos	26
<b>Capítulo I - Estudo histológico e imunolocalização de proteínas do citoesqueleto nos ovários de três espécies de lagartos da família Leiosauridae (Reptilia: Squamata)</b>	<b>31</b>
Objetivos Específicos	34
Resultados	35
Discussão	55
Conclusões	60
<b>Capítulo II - Estudo histológico e imunolocalização de proteínas do citoesqueleto em testículos e epidídimos de três espécies de lagartos da família Leiosauridae (Reptilia: Squamata)</b>	<b>61</b>
Objetivos Específicos	64
Resultados	65
Discussão	88
Conclusões	94
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>96</b>

## 1.0 - INTRODUÇÃO

Dentre as 10450 espécies de répteis atuais existentes no mundo, 6263 são de lagartos, 3619 de serpentes, 346 de quelônios (cágados, jabutis e tartarugas), 196 de anfisbênas, 25 de crocodilianos (crocodilos e jacarés) e 1 de rhyngocephalia (tuataras), sendo os lagartos (Ordem Squamata) o grupo mais diversificado (Uetz, 2017).

A família Leiosauridae, é representada atualmente por sete gêneros de lagartos: *Anisolepis*, *Aperopristsis*, *Diplolaemus*, *Enyalius*, *Leiosaurus*, *Pristidactylus* e *Urostrophus* (Frost *et al.*, 2001), sendo que entre estes, treze espécies podem ser encontradas distribuídas pelo Brasil (Bérnils & Costa, 2012). Leiosauridae é um grupo ecologicamente diversificado da América do Sul, incluindo táxons arbóreos, como *Enyalius* e *Urostrophus*, e terrestres tais como os *Pristidactylus* (Frost *et al.*, 2001). Apesar desta grande diversidade, quase nada se sabe sobre estes lagartos, e as poucas informações disponíveis são restritas aos hábitos alimentares e ao uso de microhabitats (Zamprogno *et al.*, 2001).

Em outras espécies de lagarto, existem trabalhos sobre a descrição histológica de ovários, tais como em *Sceloporus torquatus torquatus* (Uribe *et al.*, 1995) *Ctenosaura pectinata* (Uribe & Guillette, 1996), *Podarcis sicula* (Maurizii & Taddei, 1996), *Mabuya mabouya* (Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004), *Hemidactylus mabouia* (Moodley & Van Wyk, 2007), *Tropidurus hispidus* e *Tropidurus semitaeniatus* (Santos *et al.*, 2015), de testículos, tais como em *Sceloporus aeneus* (Hernandez-Gallegos *et al.*, 2014) *Tropidurus torquatus* (Mendes, *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2016) e de testículos e epidídimos, tais como em *Uta stansburiana stejnegeri* (Hahn, 1964), *Sitana ponticeriana* (Akbarsha *et al.*, 2006), *Tropidurus itambere* (Ferreira *et al.*, 2009), *Psammophilus blanfordanus* (Singh *et al.*, 2016). No entanto, não existem tais estudos em *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* e *Urostrophus vautieri*, representantes da família Leiosauridae. O presente estudo visa contribuir com informações para ajudar a estabelecer padrões de similaridades e disparidades nestes órgãos do sistema reprodutor feminino e masculino de *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* e *Urostrophus vautieri*, representantes da família Leiosauridae.

Em relação à localização imuno-histoquímica de proteínas do citoesqueleto em ovários, testículos e epidídimos, não há relato nestas três espécies de lagartos da família Leiosauridae e raros são os artigos sobre este assunto em outros lagartos, podendo ser citado o

descrito em ovário de *Podarcis sicula*, por Maurizii & Taddei (1996). Entretanto, em outros répteis e em espécies de outros grupos zoológicos, existem relatos de estudo comparativo de imunolocalização destas proteínas em testículos de jacaré e tartaruga (Pfeiffer & Vogl, 1992), em testículo e epidídimo de aves e coelhos (Abd-Elmaksoud, 2009), em epidídimo de duas espécies de aves (Ozegbe *et al.*, 2010) e em ovário de três espécies de vertebrados ectotérmicos: teleósteo, anfíbio e réptil (Van Nassauw *et al.*, 1991).

Estas pesquisas são importantes, pois podem ajudar a elucidar o papel destas proteínas do citoesqueleto na histofisiologia de órgãos do sistema reprodutor feminino e masculino destas espécies estudadas. Portanto, no presente estudo investiga-se, através de técnica imunohistoquímica, a presença e distribuição de alfa-actina de músculo liso (microfilamento), desmina e vimentina (filamentos intermediários) em ovários, testículos e epidídimo de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* para ajudar a formar uma base de dados sobre a biologia reprodutiva destes lagartos que possam ser comparados com outras espécies de répteis, bem como com outros vertebrados.

## 2.0 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Espécies estudadas representantes da família Leiosauridae

#### Gênero *Enyalius*

Compreende nove espécies de lagartos típicos de florestas. A maioria das espécies ocorre na Mata Atlântica brasileira (Rodrigues *et al.*, 2006), embora algumas ocorram em outros ambientes, como na Floresta Amazônica ( *Enyalius leechii*; Vitt *et al.*, 1996) e nos brejos-de-altitude da Caatinga (*Enyalius bibronii*; Borges-Nojosa & Caramaschi, 2004).

- *Enyalius bilineatus* (Duméril & Bibron, 1837) (Fig. 1A)

É uma espécie de lagarto habitante de regiões florestadas, encontrada principalmente nas matas ciliares associadas à Mata Atlântica do sudeste do Brasil (Jackson, 1978) ou mesmo no Cerrado do Brasil Central (Zatz, 2002). Em Minas Gerais a espécie foi registrada em matas preservadas da Estação Ambiental de Peti por Bertoluci *et al.* (2009) e em Viçosa em áreas antropizadas e em matas em regeneração ou secundárias por Costa *et al.* (2009), sendo considerada uma espécie tolerante (Teixeira *et al.*, 2005). Esta espécie ocorre principalmente em áreas alteradas como plantações de café e vegetação de segundo crescimento, ocasionalmente entram na floresta (Teixeira *et al.*, 2005).

A dieta de *E. bilineatus* baseia-se em artrópodes, como artrópode generalista, o qual utiliza a tática de forrageamento do tipo senta-e-espera. O encontro de diplópodes em sua dieta sugere que a espécie forrageie no chão (Zamprogno *et al.*, 2001). A reprodução aparentemente está associada à estação chuvosa, as fêmeas comumente apresentam uma postura com 2 a 6 ovos (Teixeira *et al.*, 2005).

- *Enyalius perditus* (Jackson, 1978) (Fig. 1B)

É um lagarto semi-arborícola de porte relativamente pequeno, restrito a áreas florestais tropicais, sua história familiar é ainda desconhecida (Sousa, 2000). É uma espécie escassa e endêmica do Brasil, sensível à fragmentação florestal e parece não tolerar ambientes perturbados (Jackson, 1978). Apresenta distribuição ampla na Mata Atlântica do sudeste do

Brasil, ocorrendo no Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e no Paraná (Jackson, 1978; Sousa, 2000).

*E. perditus* apresenta olhos dourados, os machos são de cor verde folha e as fêmeas são marrons, com desenhos hexagonais de cor escura nas paravertebrais e/ou listas longitudinais claras, paralelas ao dorso (Jackson, 1978; Sousa, 2000). Além do dimorfismo sexual quanto ao padrão de coloração (Jackson, 1978), há diferenças morfológicas; fêmeas são pouco maiores que os machos quanto ao comprimento rostro-anal, mas estes apresentam, em proporção, caudas maiores (Sousa, 2000).

Em período reprodutivo, machos podem apresentar um amarelo alaranjado nos membros posteriores, com manchas irregulares claras, e ao longo da cauda, tendendo a escurecer gradualmente até o final desta. As fêmeas podem apresentar pequenas linhas horizontais ou traços irregulares na parte superior da cabeça, de cor verde musgo ou amarronzado e pontos e/ou pequenos traços brancos ou creme incompletos no dorso, a partir do pescoço (Lima & Sousa, 2006).

### **Gênero *Urostrophus***

Compreende apenas duas espécies de lagartos neotropicais *Urostrophus gallardoi* (Etheridge & Williams, 1991), distribuído no noroeste da Argentina e sul da Bolívia (Etheridge & Williams, 1991; Bérnils *et al.*, 2007) e *Urostrophus vautieri*, uma espécie endêmica brasileira (Etheridge & Williams 1991; Sazima & Haddad, 1992; Bérnils *et al.* 2001; Ribeiro & Sousa, 2006; Bérnils *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009; Gasparini *et al.*, 2010).

- *Urostrophus vautieri* (Duméril & Bibron, 1837) (Fig. 1C)

*Urostrophus vautieri* é um lagarto tipicamente encontrado no Bioma da Mata Atlântica brasileira (Etheridge & Williams, 1999), nos estados do Sudeste e na região Sul (Etheridge & Williams, 1991). No entanto, esta espécie foi observada recentemente no Bioma Cerrado (Santos *et al.*, 2009). Apresenta hábito semi-arborícola e atividade diurna, sua dieta é provavelmente baseada em artrópodes (Sazima & Haddad, 1992).



**Figura 1:** A) *Enyalius bilineatus*; B) *Enyalius perditus*; C) *Urostrophus vauieri*.  
Fontes: a: Foto de V. D. Fernandes b: Foto de L. M. C. Lima c: Foto de Rodrigo C. Santos.

## 2.2 - Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica surgiu em 1941, descrita por Coons. Esta técnica engloba três grandes disciplinas: a histologia, imunologia e a química. A imuno-histoquímica permite localizar antígenos específicos presentes no tecido, através da utilização de anticorpos comerciais com uma leitura fácil ao microscópio óptico e com uma sensibilidade elevada (Lourenço, 2008; Pires *et al.*, 2010).



A imuno-histoquímica é uma técnica que pode ser realizada por diferentes métodos, sendo os indiretos enzimáticos, os mais utilizados atualmente. Os métodos diretos só usam um anticorpo ligado à enzima, oferecendo muitos resultados falsos positivos (Pires *et al.*, 2010).

A recuperação antigênica pelo calor, método introduzido por Shi e colaboradores (1991), permitiu a utilização de tecidos parafinados e os estudos retrospectivos. A variação do tempo e tampão, utilizado neste passo crítico da imuno-histoquímica, permite também que possam ser usados em tecidos animais, anticorpos produzidos para antígenos humanos. Este fenômeno designa-se reatividade cruzada (Pires *et al.*, 2010).

Os anticorpos podem ser monoclonais e policlonais. Os anticorpos monoclonais são produzidos *in-vitro*, projetados para produzir anticorpos específicos contra o epítopo do antígeno pretendido, enquanto, os anticorpos policlonais são produzidos *in vivo*, em geral em coelhos ou cabras. Os anticorpos monoclonais são mais específicos que os policlonais (Pires *et al.*, 2010).

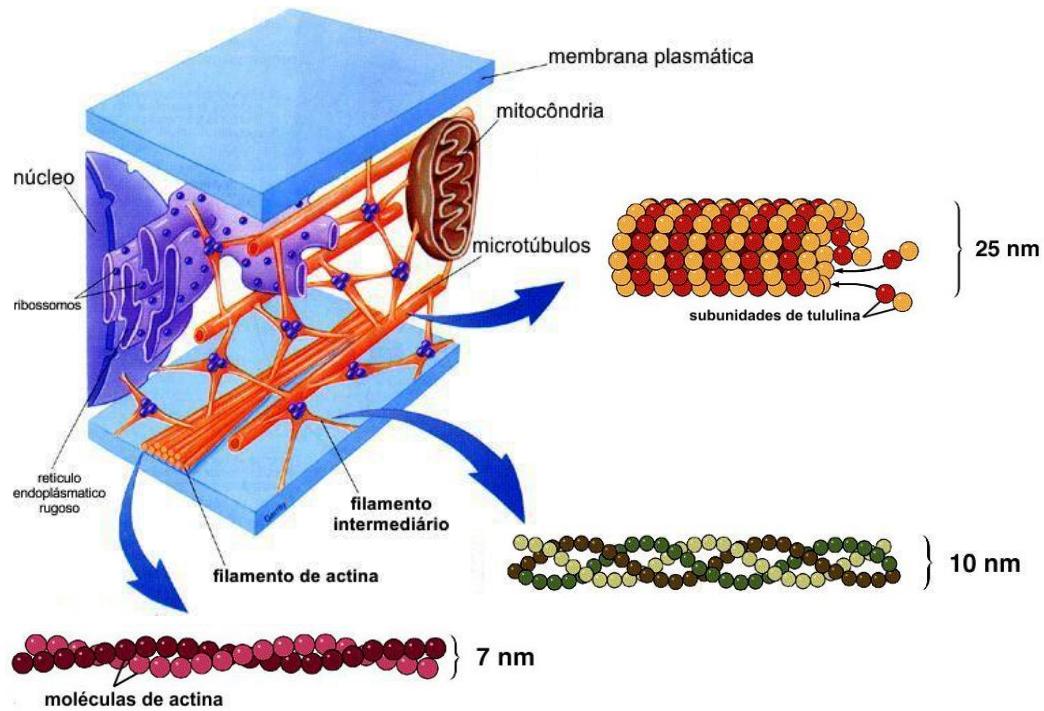
A imuno-histoquímica é amplamente utilizada em histologia e patologia, para fins de investigação científica e como complemento de diagnóstico clínico de múltiplas doenças, agentes infecciosos, sendo mais utilizada no diagnóstico de neoplasias, caracterização morfológica, estudo de fatores de prognóstico e como auxiliar terapêutico (Taylor, 2014).

### **2.3 - Proteínas do Citoesqueleto**

O Citoesqueleto é uma rede tridimensional composta por complexos proteicos fibrilares, formados pela polimerização de proteínas globulares distribuídas por todo o citoplasma das células eucariotas (Kierszenbaum, 2012). Sua principal função é coordenar a distribuição de organelas na célula e orientar sua forma, contribuindo para a integridade estrutural das mesmas (Schiwa & Van Blerkom, 1981). Além destas funções citadas, o citoesqueleto é também responsável pela sustentação, resistência da célula, alterações de forma e da distribuição de organelas desencadeadas por interações entre a célula-matriz extracelular e entre células diferentes (Hermann *et al.*, 2003). Além disso, também atua em eventos de diferenciação celular (Luna & Hitt, 1992, Kierszenbaum, 2012).

O citoesqueleto é formado por três tipos de polímeros de elevado peso molecular, sendo estes diferenciados em microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários ou a associação entre eles (Esq. 01). Essa complexa rede citoplasmática pode ligar-se à membrana

plasmática e às membranas de outras organelas através de interações com certas proteínas associadas. É uma estrutura dinâmica, que se altera através de variações entre as taxas de polimerização e despolimerização (Hermann & Aebi, 2004; Ortega *et al.*, 2007).



Esquema 01. Ilustração adaptada sobre os elementos do citoesqueleto (Moore *et al.*, 1998).

## Alfa-actina

As actinas são proteínas presentes somente nas células eucarióticas envolvidas em diversas funções celulares incluindo contração muscular, motilidade, adesão e divisão celular, bem como, manutenção da morfologia celular (Chaponnie & Gabbiani, 2004). Em vertebrados, constitui uma família de seis proteínas, expressas em padrões específicos no desenvolvimento de cada tecido (McHugh *et al.*, 1991). A estrutura primária de todas as seis isoformas de actina é completamente conservada entre as espécies de aves até os seres humanos (Kabsch & Vandekerckhove, 1992).

A alfa-actina de músculo liso é um microfilamento (5-8 nm de diâmetro) que compõe o citoesqueleto de todas as células musculares lisas de mamíferos, células mioepiteliais, e particularmente abundantes em células musculares lisas de paredes de vasos, tendo uma

importante função contrátil nestas células (McHugh *et al.*, 1991). Está também presente em células conjuntivas como fibroblastos (Kinner *et al.*, 2002) e miofibroblastos (Hinz, 2007).

Existem quatro isoformas restritas a tipos teciduais, como,  $\alpha$ -actina esquelética,  $\alpha$ -actina cardíaca,  $\alpha$ -actina de músculo liso e  $\gamma$ -actina de músculo liso, expressas respectivamente em músculos esquelético, estriado cardíaco, musculatura lisa vascular e entérica (Chaponnie & Gabbiani, 2004).

O anticorpo monoclonal para alfa-actina de músculo liso foi caracterizado por Skalli *et al.* (1986). Este anticorpo reconhece as fibras musculares lisas na parede dos vasos sanguíneos, assim como células mioepiteliais e elementos estromais em carcinomas mamários.

O marcador imuno-histoquímico alfa-actina de músculo liso não reage com a actina de células musculares esqueléticas ou cardíacas (Mello & Alves, 1999). Reações intensas e difusas costumam ser consideradas como evidência de diferenciação para músculo liso (Mello & Alves, 1999).

## **Desmina**

A desmina é uma proteína que pertence à família dos filamentos intermediários, assim como a vimentina, a nestina e as citoqueratinas (Paulin & Li, 2004). A desmina tem cerca de 10 nm de diâmetro (Geisler, 1982) e foi purificada pela primeira vez em 1977 e caracterizada bioquimicamente em 1989 (O'Shea *et al.*, 1981; Li, 1989).

A desmina é considerada a principal proteína de tipo III dos filamentos intermediários. É específica do tecido muscular estriado e liso (Lyall & Bulmer, 2013; Diokmetzidou *et al.*, 2016). Em células musculares lisas, a desmina apresenta uma localização citoplasmática, concentrada nos corpos densos (Paulin & Li, 2004; Heckmann *et al.*, 2016).

Acredita-se que, as funções primárias da desmina sejam estruturais e mecânicas, oferecendo elasticidade e ao mesmo tempo rigidez às células, tal como uma teia tridimensional com várias estruturas celulares interligadas (Paulin & Li, 2004), sendo responsável pela regulação de motilidade e contractilidade celular (Helfand *et al.*, 2004).

A desmina também está envolvida no processo de apoptose, interagindo com proteases como a caspase. Esta proteína tem ainda a particularidade de ser resistente e estável a processos químicos de desnaturação (Costa *et al.*, 2004).

## Vimentina

O filamento de vimentina é formado pela união de dois homodímeros pelo domínio central, dando origem a dímeros. Os dímeros podem se associar e formar tetrâmeros que se reúnem em protofilamentos gerando, então, os filamentos de vimentina (Hermann & Aebi, 2004).

A vimentina é um filamento intermediário (10 nm de diâmetro) presente na maioria das células mesenquimais, sendo usada como marcador do desenvolvimento celular e tecidual (Ivaska *et al.*, 2007; Lazarides, 1980). Além disso, essa proteína possui um alto grau de homologia entre as espécies, desde peixes até humanos, sugerindo algum papel importante no processo fisiológico evolutivo devido a sua conservação entre as espécies (Schaffeld *et al.*, 2001).

A proteína vimentina tem mostrado participação em um grande número de funções críticas, frequentemente relatada na organização de proteínas envolvidas na adesão celular, na migração, na sinalização celular, na ancoragem do núcleo das células e no posicionamento de suas organelas no citoplasma, sendo, portanto, uma molécula integradora mecânica do citoplasma celular. Muitas de suas funções têm sido descobertas através de estudos dirigidos para a regulação da vimentina, associados a sua fosforilação. No entanto, algumas de suas funções ainda são desconhecidas (Henderson & Weber, 1980; Lazarides, 1980; Ivaska *et al.*, 2007).

### 3.0 - OBJETIVOS

- Descrever a estrutura dos ovários, testículos e epidídimos de *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* e *Urostrophus vautieri*, através da histologia.
- Identificar glicoproteínas ácidas e neutras nos ovários, testículos e epidídimos das três espécies de lagartos estudadas, através de reações histoquímicas específicas.
- Descrever a distribuição de alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina nos ovários, testículos e epidídimos de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri*, através do método imuno-histoquímico específico.

## 4.0- MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - Estudos Histológico e Histoquímico

No presente estudo foram utilizados machos e fêmeas dos lagartos *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* e *Urostrophus vaultieri*, representantes da família Leiosauridae, sendo quatro lagartos de cada espécie e dois espécimes de cada sexo. Estes lagartos encontram-se acondicionados em meio líquido (formol 10%) e depositados na Coleção Herpetológica (Tabela 1) do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG.

**Tabela 1.** Dados dos animais utilizados neste estudo.

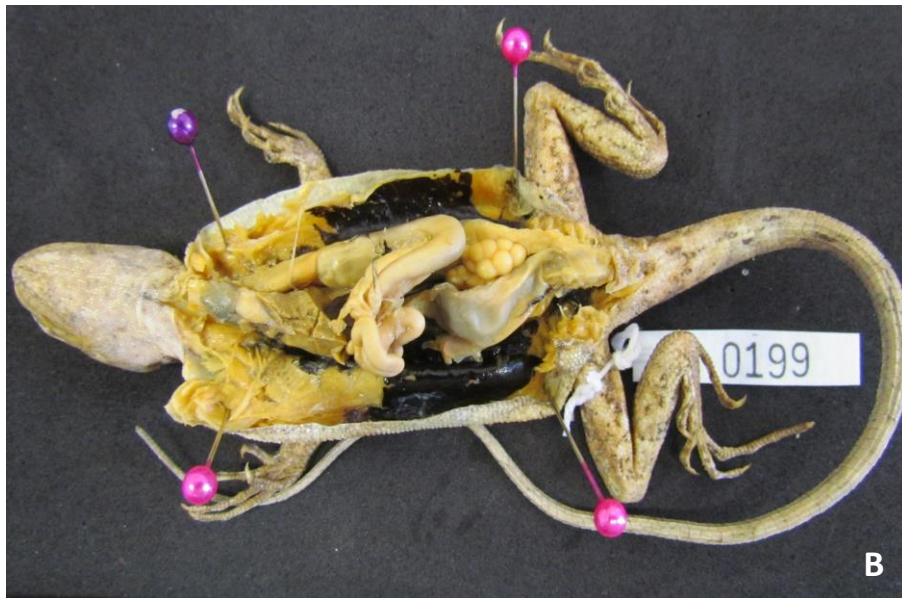
	Número de tombo	Sexo	Local de coleta
<i>Enyalius bilineatus</i>	62	Fêmea	Juiz de Fora (MG)
	82	Fêmea	Juiz de Fora (MG)
	86	Macho	Rio Preto (MG)
	450	Macho	Ritópolis (MG)
<i>Enyalius perditus</i>	198	Fêmea	Ibitipoca (MG)
	199	Fêmea	Ibitipoca (MG)
	272	Macho	Juiz de Fora (MG)
	273	Macho	Juiz de Fora (MG)
<i>Urostrophus vaultieri</i>	80	Fêmea	Lima Duarte (MG)
	109	Fêmea	Ibitipoca (MG)
	560	Macho	Passa Quatro (MG)
	25	Macho	X

A dissecação dos espécimes contou com o auxílio de tesouras e pinças apropriadas, deixando deste modo, exposta a cavidade celomática (Fig. 2). Em seguida, órgãos do aparelho reprodutor feminino e masculino, foram retirados e devidamente identificados, conservados em álcool 70% em frascos de vidros e encaminhados ao Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ.

Para fim de comparação anatômica, os ovários, testículos e epidídimos passaram por avaliações quanto ao aspecto e localização em relação aos outros órgãos da cavidade celomática. Estes órgãos foram clivados em seções transversais e longitudinais e submetidos as demais etapas do processamento histológico de rotina que incluíram: desidratação (em uma série crescente de etanol - 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina-Histosec para obtenção de cortes histológicos de 5 µm de espessura em micrótomo automático.

Os cortes histológicos dos ovários, testículos e epidídimos de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri*, foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE) para visualização da arquitetura geral dos órgãos, Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue pH 2.5 para detecção de glicosaminoglicanas neutras e ácidas, respectivamente e Tricrômico de Mallory para diferenciação de fibras colágenas.





**Figura 2:** A) Exemplar utilizado da espécie *Urostrophus vaultieri*. B) Exemplar utilizado da espécie *Enyalius perditus*. C) Exemplar utilizado da espécie *Enyalius bilineatus*.



## 4.2 - Protocolo imuno-histoquímico

As secções histológicas dos ovários, testículos e epidídimos foram desparafinadas em dois banhos de xilol (20 minutos em cada), hidratadas em uma série decrescente de etanol - 100°, 90°, 80° e 70° GL, respectivamente (5 minutos em cada), e incubadas por 15 minutos em peróxido de hidrogênio a 3% diluído na hora. Em seguida, permaneceram por mais 15 minutos na mesma solução, porém diluída após o término dos primeiros 15 minutos para bloqueio de peroxidases endógenas. Após a lavagem das lâminas com água destilada, estas ficaram em banho maria com tampão citrato (pH 6,0) em temperatura aproximada de 98°C por 15 minutos para recuperação antigênica. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com leite desnatado a 5 % (Molico® - Indústria Brasileira) por 30 minutos. Os cortes foram incubados “overnight” com os anticorpos alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina, diluídos em PBS (“Phosphate Buffer Saline”- pH 7,4, 0,01M), conforme as sugestões dos fabricantes (Tabela 2).

O sistema de detecção utilizado neste protocolo foi o REVEAL polímero-HRP, livre de biotina (Spring) e como cromógeno a Diaminobenzidina (DAB). Todas as seções foram contracoradas com hematoxilina de Harris e após desidratação em álcool e diafanização em xilol, as lâminas sinalizadas foram montadas com lamínula e Entellan (Merck, Darmstadt, Germany), por fim todas as secções foram avaliadas em microscópio ótico.

**Tabela 2.** Tabela com os detalhes sobre os anticorpos primários utilizados neste estudo.

Anticorpo Primário	Código	Diluição	Laboratório
Anti-alpha smooth muscle Actin antibody (polyclonal)	ab5694	1:300 µl	Abcam
Anti-Desmin antibody [DE-U-10] - Cytoskeleton Marker (monoclonal)	ab6322	1:100 µl	Abcam
Antibody to human Vimentin (monoclonal)	Mob090-A	1:50 µl	Diagnostic BioSystems

### **4.3 - Material controle**

Para confirmar a especificidade e eficácia das reações imuno-histoquímicas, foram utilizados controles negativos e positivos para cada anticorpo utilizado. Por substituição do anticorpo primário por soro normal não-imune, os controles negativos foram definidos. Para os controles positivos, foram utilizados cortes histológicos com: tonsila palatina com lâmina própria bastante vascularizada (para o anti-alfa-actina de músculo liso); tecido muscular estriado esquelético (para o anti-desmina) e tecido muscular cardíaco comum (para o anti-vimentina). A escolha destes tecidos se baseou em testes realizados previamente. As lâminas com os cortes controle foram submetidas às técnicas imuno-histoquímicas juntamente com as lâminas dos ovários, testículos e epidídimos dos animais analisados.

### **4.4 - Observações e fotomicrografias**

Todos os cortes histológicos foram observados e fotomicrografias foram feitas com câmera digital Sony DSC - W230 acoplada ao microscópio Olympus BX 41.

O aumento das fotomicrografias foi obtido pela medição da imagem com o uso de lâmina micrométrica para microscópio biológico comparando o tamanho da imagem sem zoom com a que foi utilizado o zoom da máquina fotográfica e por regra de três, foi visto quantas vezes foi aumentado.

## Capítulo I

# Estudo histológico e localização imuno-histoquímica de proteínas do citoesqueleto nos ovários de três espécies de lagartos da família Leiosauridae (Reptilia: Squamata)



## **Resumo**

O presente estudo descreve aspectos histológicos e imuno-histoquímicos dos ovários de *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* e *Urostrophus vaultieri*, que estabelecem padrões de similaridades e disparidades entre os representantes da família Leiosauridae e outros Squamatas. Os espécimes estudados encontram-se depositados na Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os ovários destes animais foram removidos e encaminhados ao Laboratório de Histologia e Embriologia, onde foram fixados, processados e então submetidos às técnicas histológicas e imuno-histoquímicas. Os ovários destes leiosaurídeos são órgãos pareados, funcionalmente ativos, repletos de folículos ovarianos, em distintos estágios de desenvolvimento folicular (pré-vitelogênicos e vitelogênicos). Estes órgãos são revestidos por epitélio cúbico simples, com uma camada de tecido conjuntivo subjacente, a túnica albugínea. A imuno-histoquímica, nos lagartos estudados, mostra uma reação de moderada a acentuada para alfa-actina de músculo liso na camada da teca e em células endoteliais dos vasos sanguíneos. Quanto ao anticorpo desmina, apenas em *E. perditus*, foi possível verificar uma acentuada imunomarcagem em fibras musculares na albugínea e no estroma ovariano; no entanto, nas três espécies analisadas, as células endoteliais dos vasos sanguíneos demonstraram reação positiva a este filamento intermediário. Não houve imunomarcagem para a vimentina em todos os lagartos e órgãos estudados. Esses resultados auxiliam a compreender como estas espécies se comportam, pois embora a reprodução não seja crucial para a sobrevivência de um indivíduo, a mesma é essencial para permanência de uma espécie.

**Palavras Chave:** Imunolocalização, répteis, alfa-actina de músculo liso, desmina, vimentina.

## **Abstract**

The aim of the current study is to gather information about the histological and immunohistochemical descriptions of *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* and *Urostrophus vautieri* ovaries, in order to help setting similarity and disparity patterns between representatives of family Leiosauridae and other Squamata. The herein studied specimens are deposited in the Herpetological Collection of Federal University of Juiz de Fora. The animals' ovaries were removed and sent to the Histology and Embryology Laboratory (UFRRJ), where they were fixed, processed and then subjected to histological and immunohistochemical techniques. The ovaries from these leiosauridae are functionally-active paired organs filled with ovarian follicles at different follicular development stages (*previtellogenic and vitellogenic*). These organs are covered by a simple cubic epithelium, which presents an underlying connective tissue layer called tunica albuginea. The immunohistochemical analysis applied to the herein studied lizards showed moderate to strong reaction to the alpha smooth muscle actin in the teak layer and endothelial cells of blood vessels. The antibody 'desmin' showed strong immunostaining in the muscle fibers of the albuginea and ovarian stroma of *E. perditus*, only; however, the endothelial cells in the blood vessels of the three herein analyzed species showed positive reaction to this intermediate filament. Vimentin did not show immunostaining in any of the studied organs and lizards. These results help better understanding how these species behave, because although reproduction is not crucial for the survival of a single individual, it is essential for the survival of the species.

**Keywords:** Immunolocalization, reptiles, smooth muscle alpha-actin, desmin, vimentin.

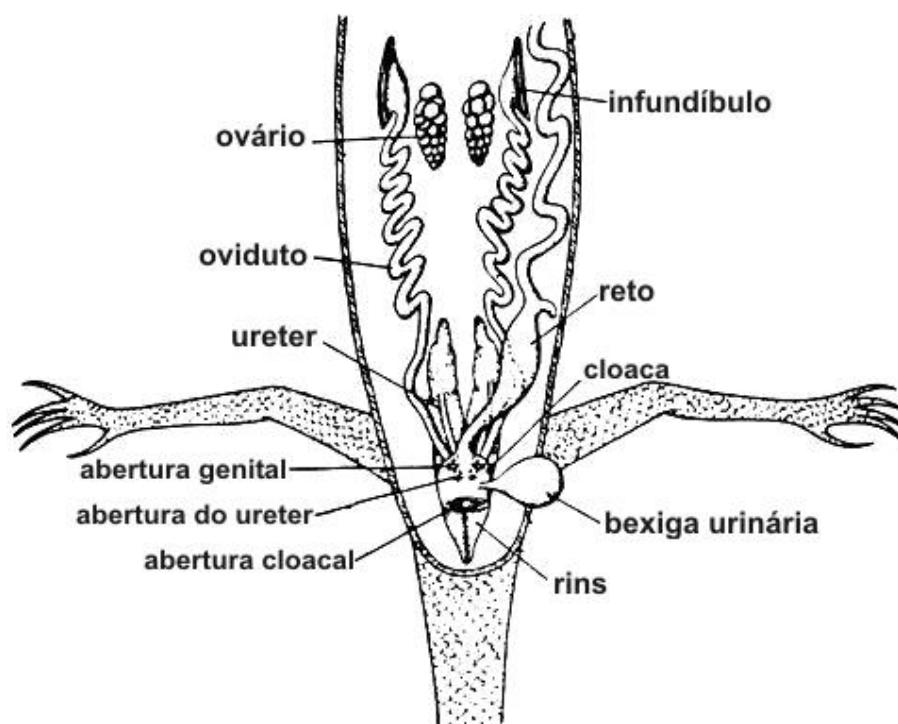
## 5.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a estrutura dos ovários de *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* e *Urostrophus vautieri*, através da histologia.
- Identificar glicoproteínas ácidas e neutras nos ovários das três espécies de lagartos estudadas, através de reações histoquímicas específicas.
- Descrever a distribuição de alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina nos ovários de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri*, através do método imuno-histoquímico específico.

## 5.2- RESULTADOS

### 5.2.1 - Estudo histológico dos ovários

Para demonstrar o arranjo dos ovários das espécies de lagartos analisados no presente estudo, foi utilizado um esquema destes órgãos do aparelho reprodutor feminino de lagartos em geral (Esq. 02).



Esquema 02. Representação de órgãos do sistema urogenital feminino de lagartos.

<http://www.biologydiscussion.com/zoology/dissection/dissection-of-garden-lizard-with-diagram-zoology/45189>

Nas três espécies analisadas, os ovários são órgãos pareados, ambos funcionalmente ativos, localizados no interior da cavidade celomática, ligados ao corpo através de uma membrana de tecido conjuntivo, o mesovário (Fig. 3). As aberturas dos dois ovidutos (infundíbulo) encontram-se próximos aos ovários. Os ovidutos desembocam na cloaca.



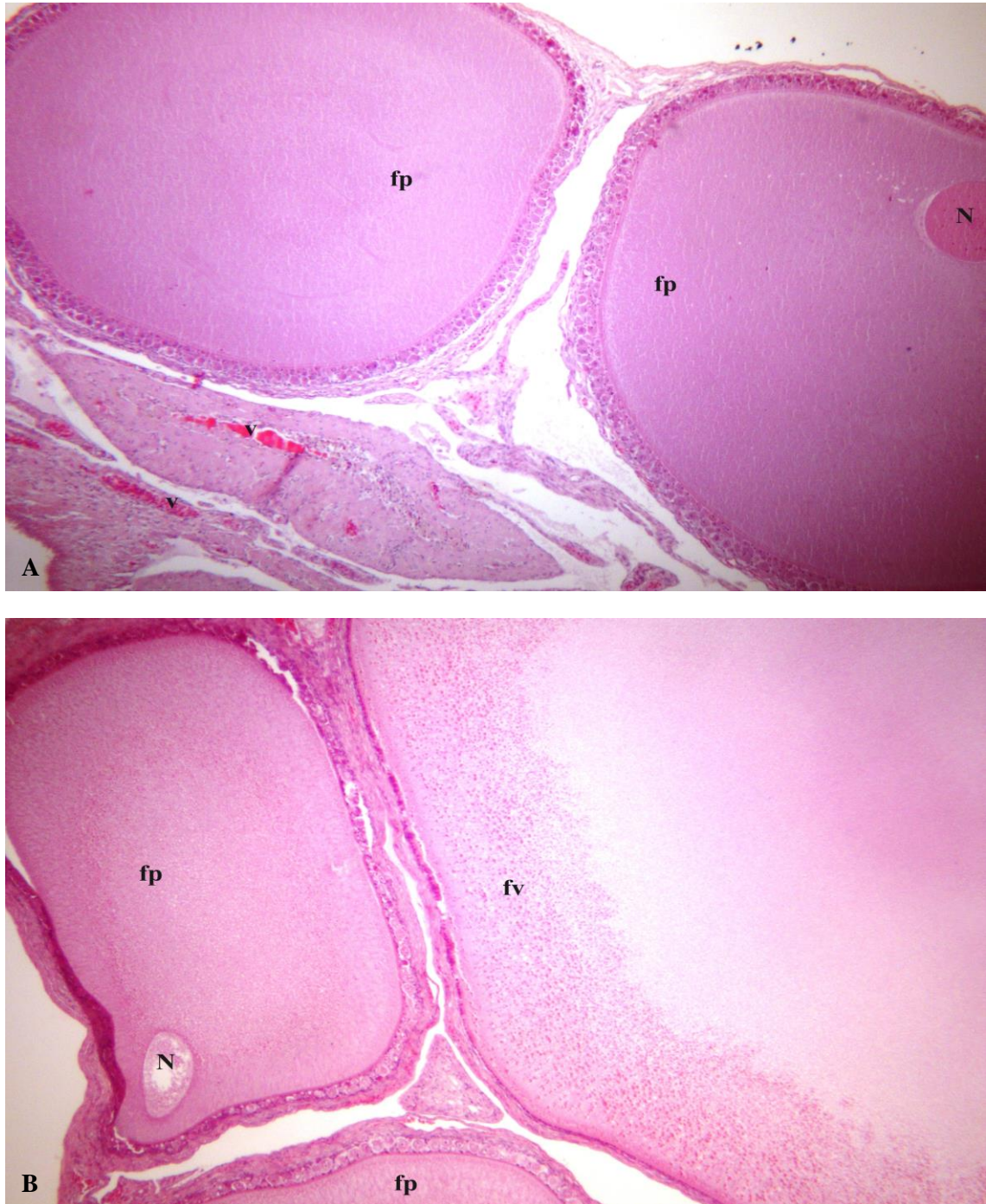
**Figura 3:** A) Aparelho reprodutor feminino de *Urostrophus vautieri*. B) Aparelho reprodutor feminino de *Enyalius perditus*. C) Aparelho reprodutor feminino de *Enyalius bilineatus*.

Os ovários das três espécies analisadas são revestidos por um epitélio cúbico simples e abaixo deste observa-se a túnica albugínea, uma camada de tecido conjuntivo denso não modelado, pouco vascularizado, cujas fibras colágenas dispõem-se concentricamente à superfície do ovário e fibras musculares lisas.

Estes órgãos dividem-se em duas regiões histologicamente difusas: o córtex e a medula. O córtex ovariano é composto por folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento. Uma característica observada é a organização dos vasos sanguíneos, pois



estes apresentam distribuídos ao redor de cada folículo, formando provavelmente uma rede vascular. A região medular é constituída por tecido conjuntivo frouxo, com nervos, vasos sanguíneos e fibras musculares lisas (Figs. 4A e 4B).

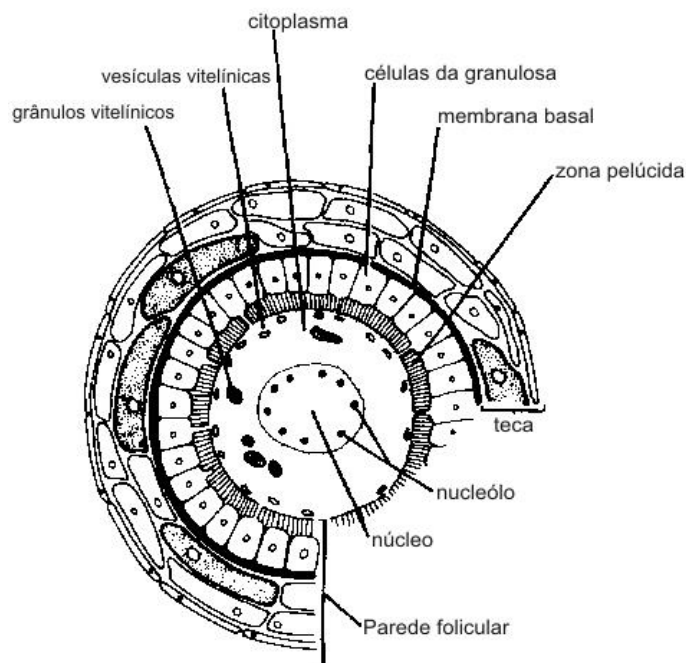


**Figura 4:** **A.** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus*. Folículos ovarianos pré-vitelogênicos (fp) na região cortical, (N) núcleo do ovócito e vaso sanguíneo (v) na região medular. (HE). Aumento de 150x. **B.** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Folículos ovarianos em distintos estágios de maturação e núcleo em posição excêntrica (N). Folículos pré-vitelogênicos (fp) e folículos vitelogênicos (fv). (HE). Aumento de 300x.

As descrições histológicas dos estágios da foliculogênese, destes lagartos representantes da família Leiosauridae foram caracterizadas por mudanças no citoplasma do ovócito durante a deposição de vitelo e nas camadas celulares da granulosa e da teca que o cercam.

Nos ovários das três espécies de lagartos estudadas foram observados dois estágios do desenvolvimento folicular: folículos pré-vitelogênicos e folículos vitelogênicos.

Verificou-se que os folículos pré-vitelogênicos consistem em um ovócito envolto pela zona pelúcida, pela camada da granulosa e pela camada da teca (Esq. 03; Fig. 5). Não foi possível distinguir limites celulares na camada da teca que é formada por uma camada concêntrica de células e fibras do tecido conjuntivo, células secretoras, além de vasos sanguíneos.



Esquema 03. Ilustração adaptada sobre os constituintes da parede de um folículo vitelogênico. Copyright © 2016 YourArticleLibrary.com.br

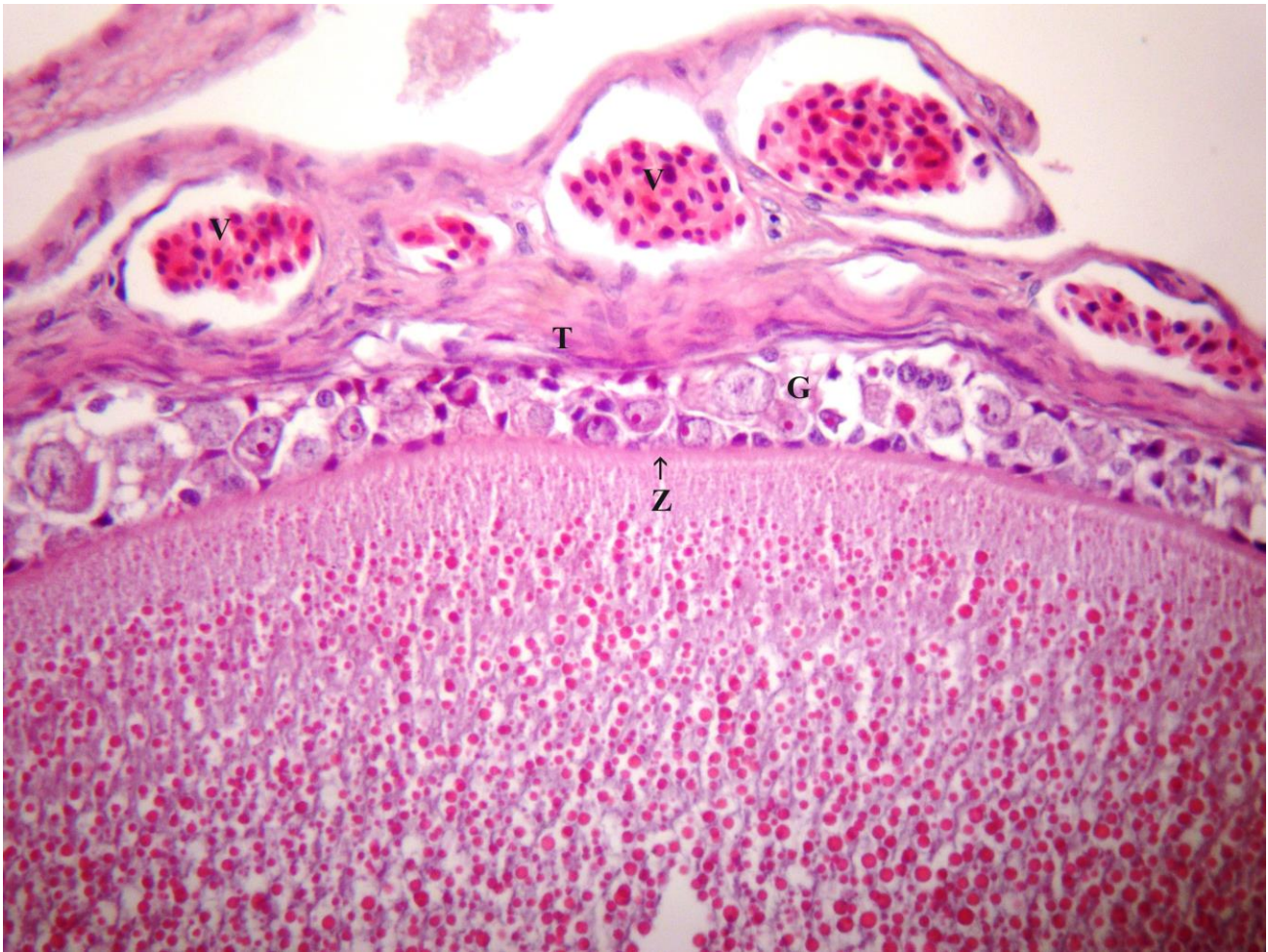
Durante o estágio, observou-se a presença de vários pequenos grânulos acidófilos de vitelo dispersos no citoplasma do ovócito, especialmente em direção à periferia do mesmo. Nas três espécies analisadas, na zona pelúcida, constituída de material amorfo, foi detectada a presença de glicosaminoglicanas neutras, visto a reação positiva ao PAS (Figs. 6A-6C). No entanto, somente em *E. bilineatus*, a zona pelúcida reagiu moderadamente ao Alcian blue (Figs.7A e 7B) demonstrando a presença de glicosaminoglicanas ácidas.

Nos folículos pré-vitelogênicos a camada granulosa é estratificada, constituída por três tipos celulares de diferentes dimensões: pequenos, intermediários e grandes (Figs. 8A e 8B). As células pequenas são encontradas na base da camada granulosa e são ovoides; as células intermediárias têm distintos formatos e as células grandes, mais externas, são globosas. Em alguns folículos pré-vitelogênicos maiores, observaram-se vários grânulos pequenos acidófilos de vitelo dispersos no citoplasma do ovócito, especialmente em direção à periferia do mesmo (Fig. 9).

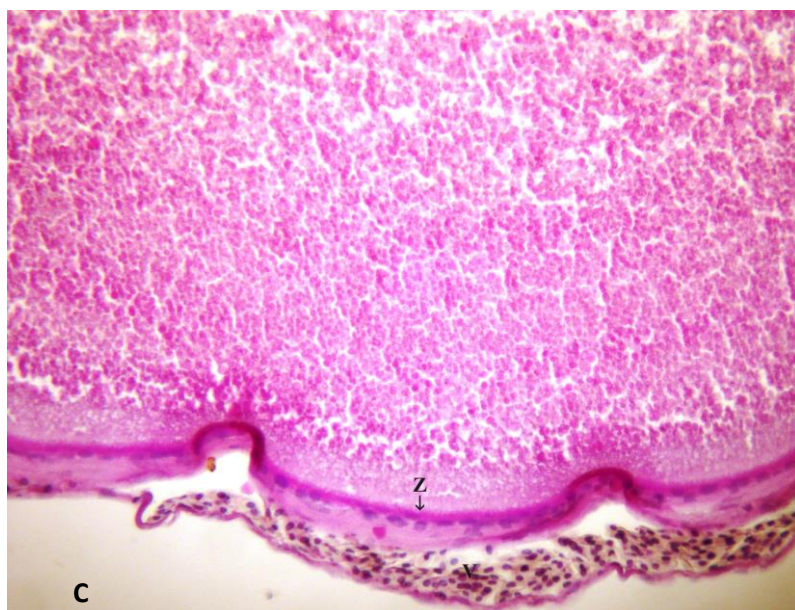
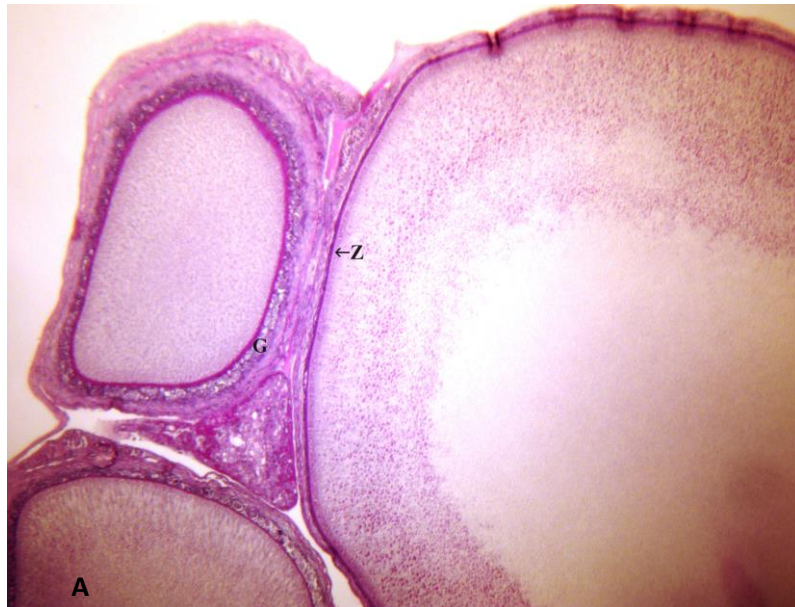
Nos folículos vitelogênicos foi verificado que existe apenas uma única camada de células da granulosa de formato cúbico (Fig. 10A). No citoplasma do ovócito destes folículos existem vários grânulos acidófilos de vitelo distribuídos no centro e na periferia (Fig. 10B). Em folículos maiores, neste estágio da foliculogênese, os grânulos de vitelo aumentam em tamanho e número e apresentam-se na área central do ovócito. Durante o crescimento folicular, o núcleo do ovócito ocupa uma posição excêntrica (Fig. 4A). Nas espécies analisadas não foi observado a presença de folículos atrésicos no estroma ovariano.

Comparando os resultados obtidos, através de análise histológica dos ovários das três espécies de leiosaurídeos pode-se sugerir que os espécimes, de cada espécie, encontravam-se em distintos períodos reprodutivos, visto que em *E. bilineatus* foram observados apenas folículos em estágio pré-vitelogênicos, enquanto que em *U. vautieri* e *E. perditus* foram observados folículos pré-vitelogênicos e vitelogênicos.



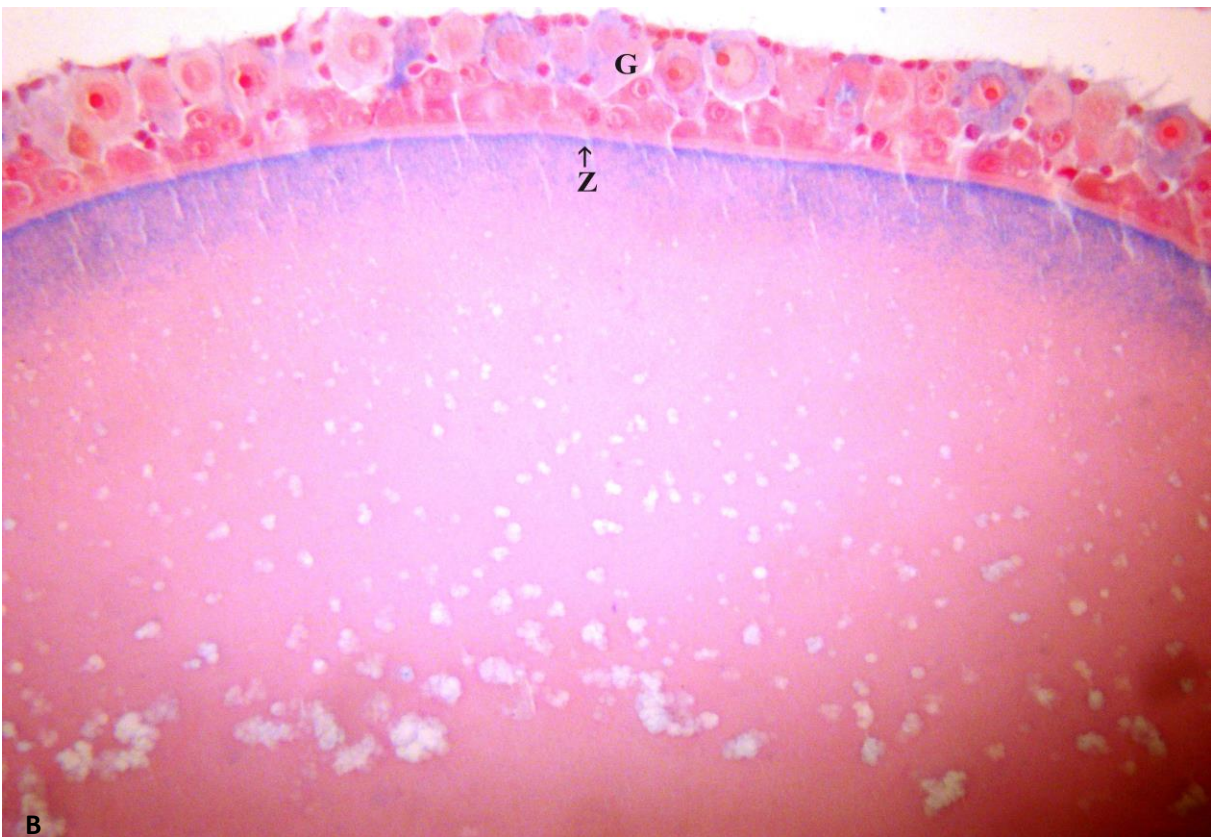
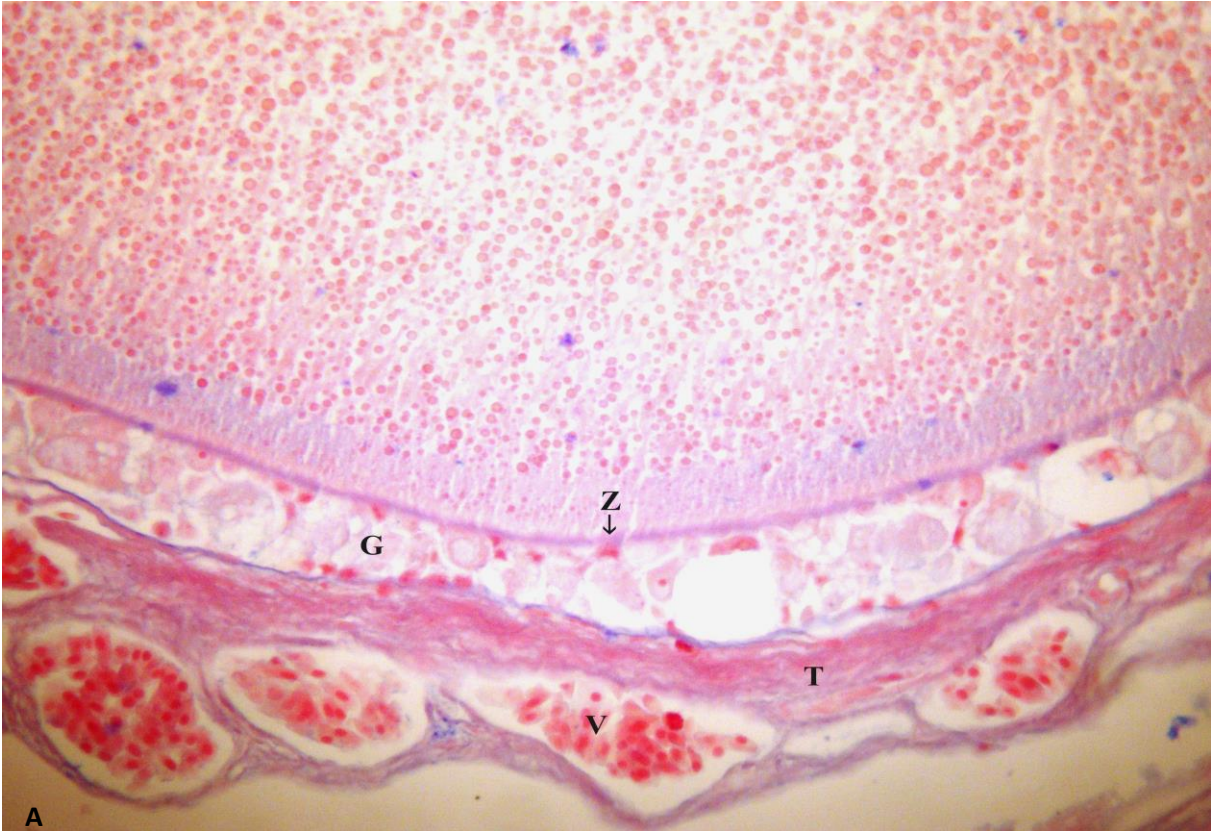


**Figura 5:** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Visão geral dos folículos ovarianos. Camada da teca (T), camada da granulosa (G), zona pelúcida (Z) e vasos sanguíneos (v). (HE). Aumento de 630x.



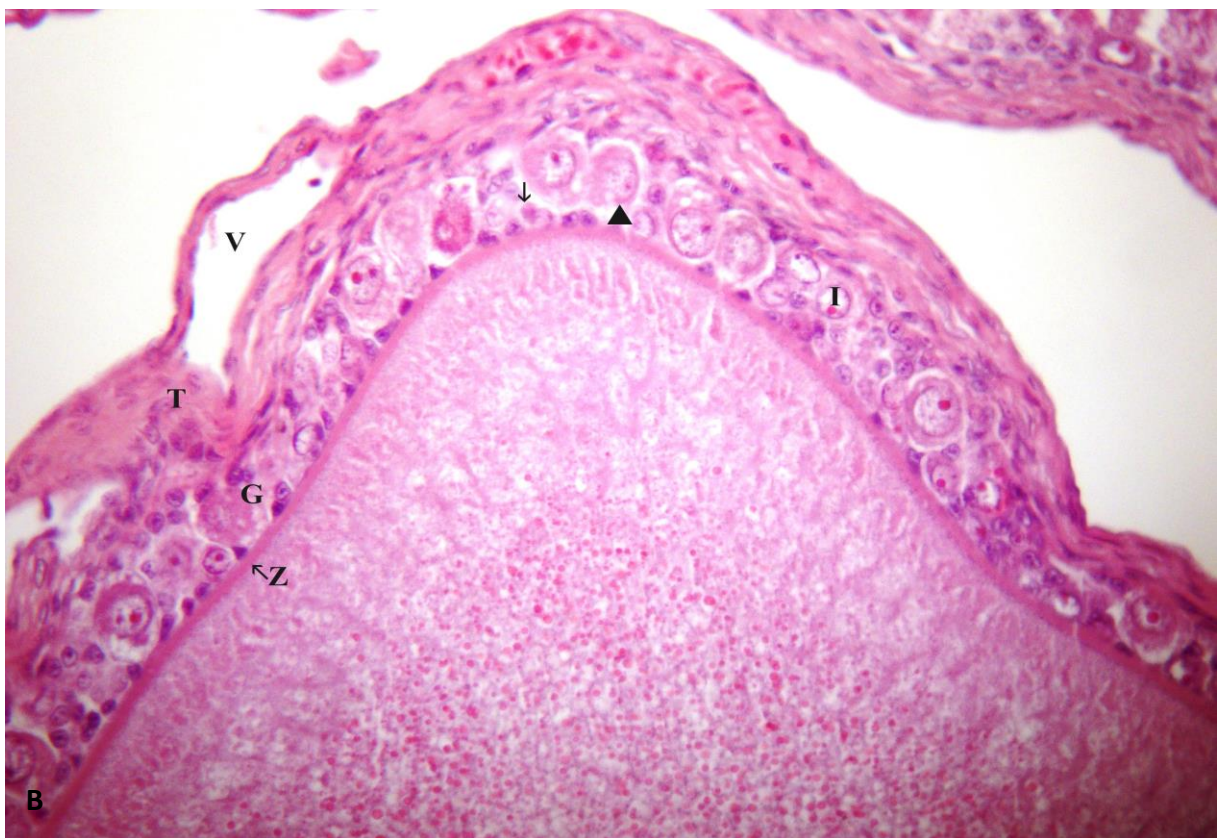
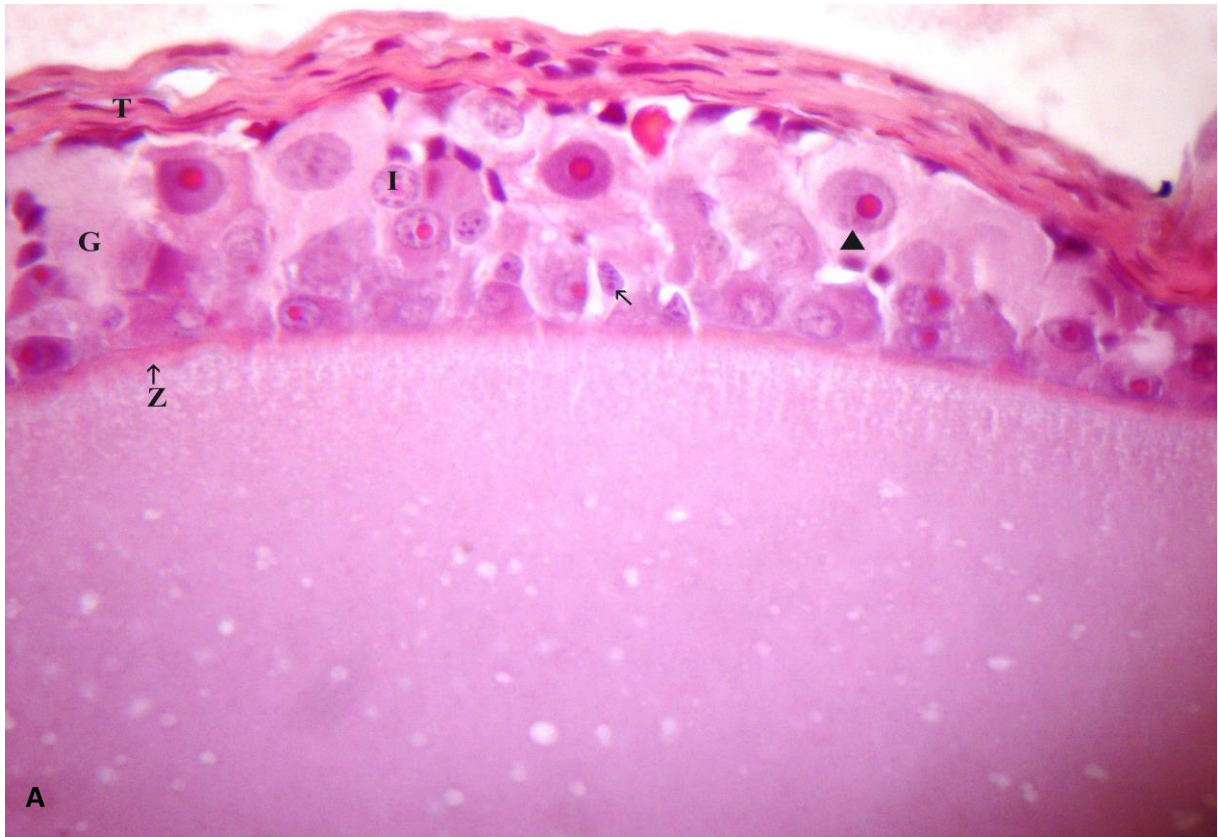
**Figura 6:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Aumento de 630x. (PAS). **B)** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus*. Aumento de 150x. (PAS). **C)** Fotomicrografia do ovário de *U. vautieri*. Aumento de 630x. (PAS). Camada da granulosa (G), zona pelúcida (Z) corada pelo PAS e vasos sanguíneos (V).





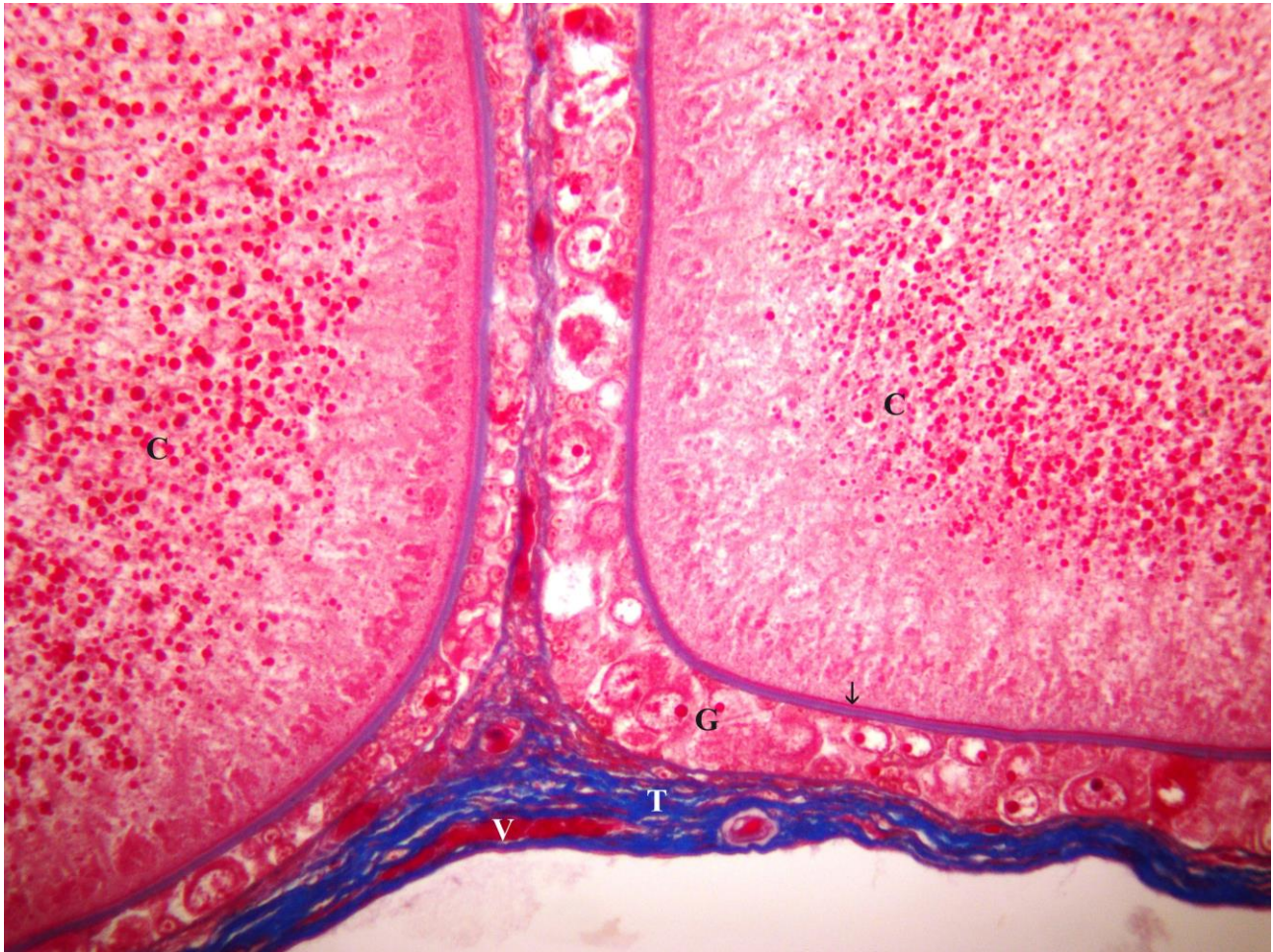
**Figura 7:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. (AB). Zona pelúcida negativa para o AB. Aumento de 630x. **B)** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus*. Zona pelúcida positiva para o AB. Aumento de 630x. (AB). Camada da teca (T), camada da granulosa (G), zona pelúcida (Z) e vasos sanguíneos (V).





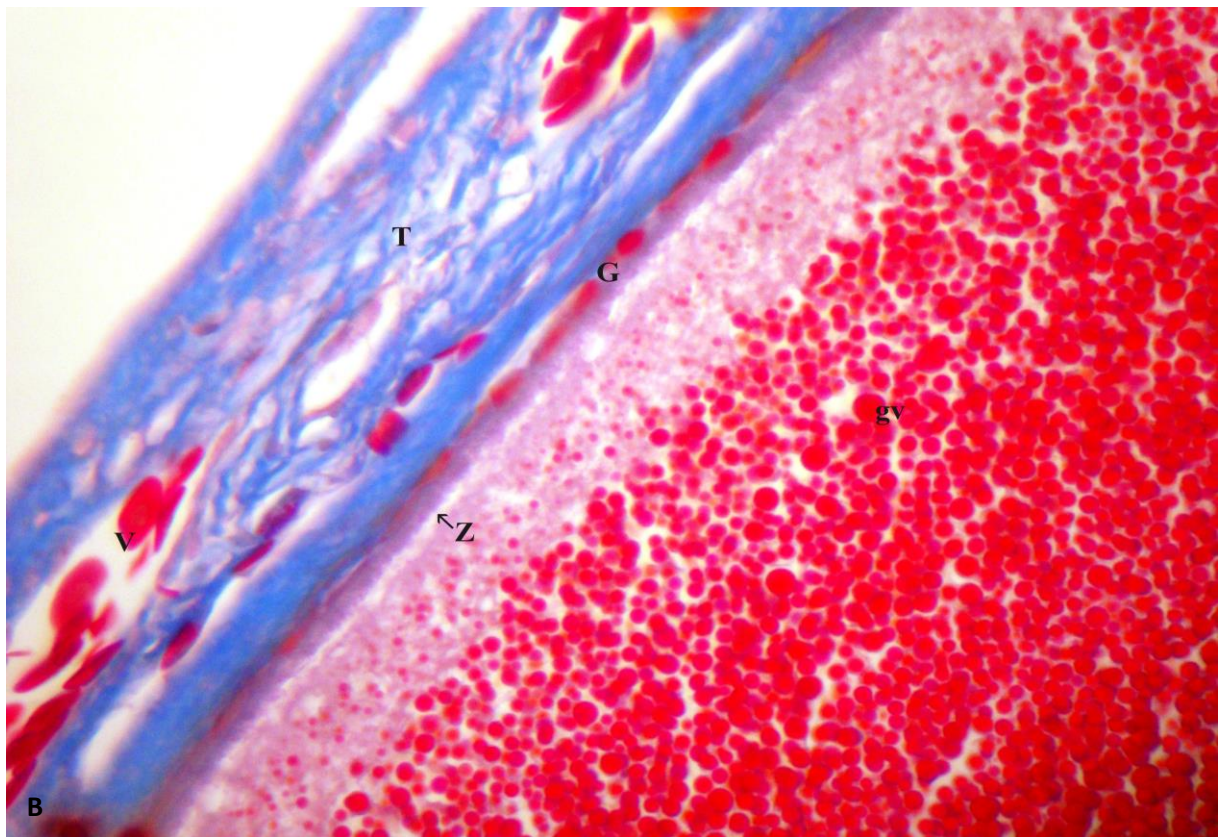
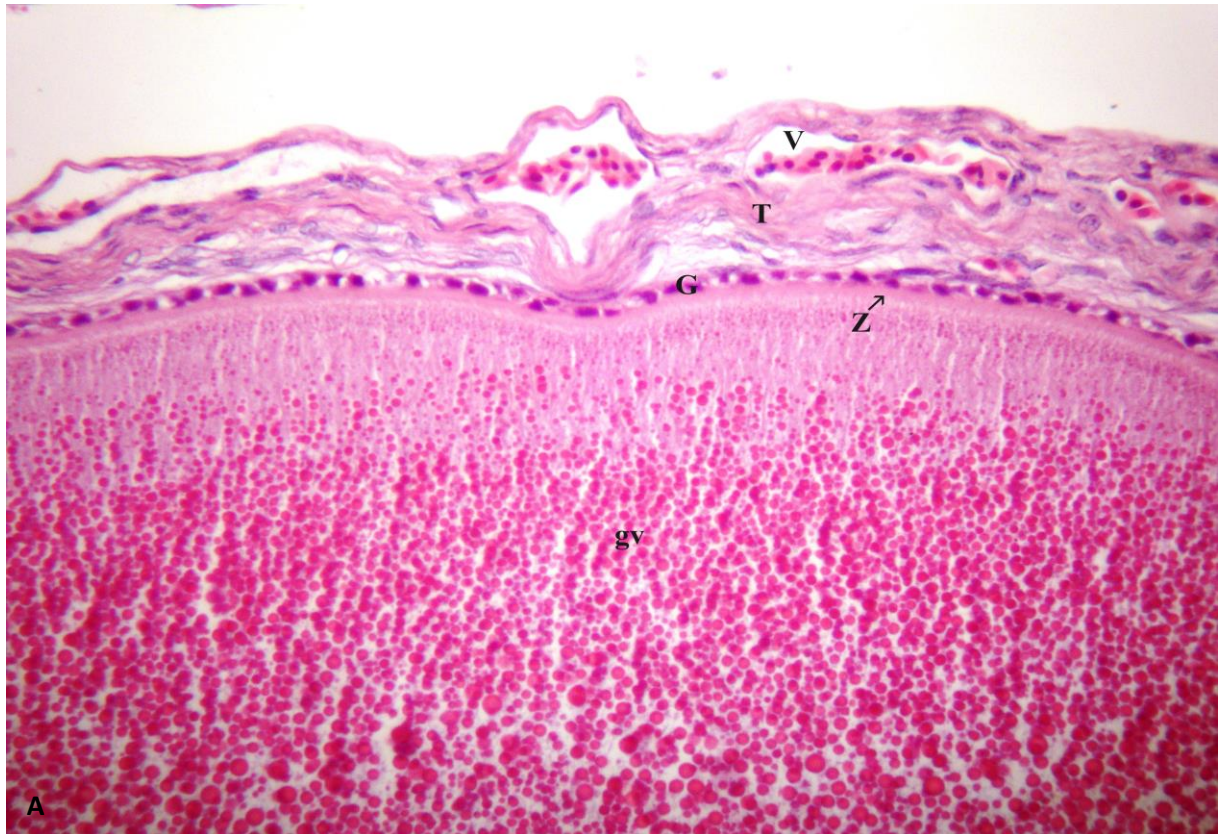
**Figura 8:** **A)** Fotomicrografia do folículo ovariano de *E. bilineatus*. Aumento de 1150x. **B)** Fotomicrografias do folículo ovariano de *E. perditus*. Visão geral dos três tipos celulares da camada granulosa: células pequenas (→), células intermediárias (I) e células grandes (▲). Camada da teca (T), camada da granulosa (G), zona pelúcida (Z→) e vasos sanguíneos (v). (HE). Aumento de 630x.





**Figura 9:** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Visão geral de um folículo ovariano pré-vitelogênico. Camada granulosa (G) e o citoplasma repleto de grânulos de vitelo (C). Fibras colágenas da camada teca coradas em azul (T), vasos sanguíneos (V), zona pelúcida (↑). (Tricrômico de Mallory). Aumento de 630x.



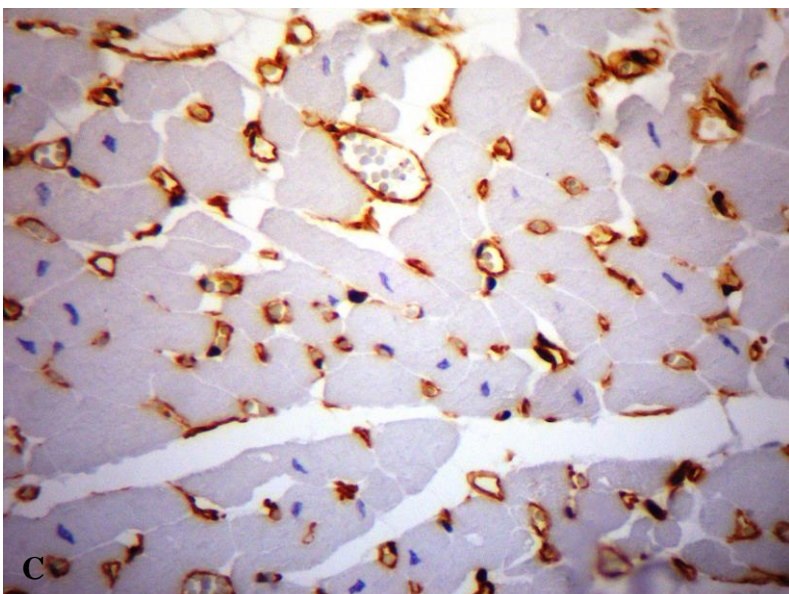
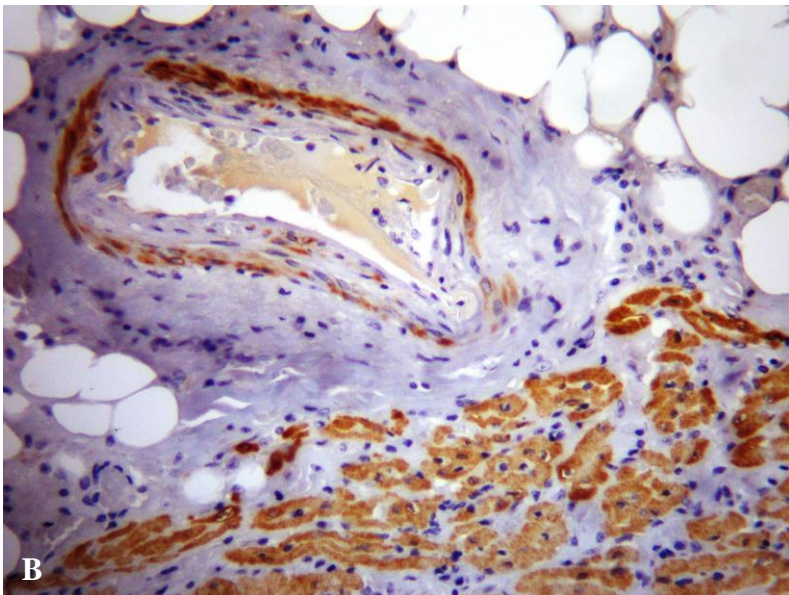
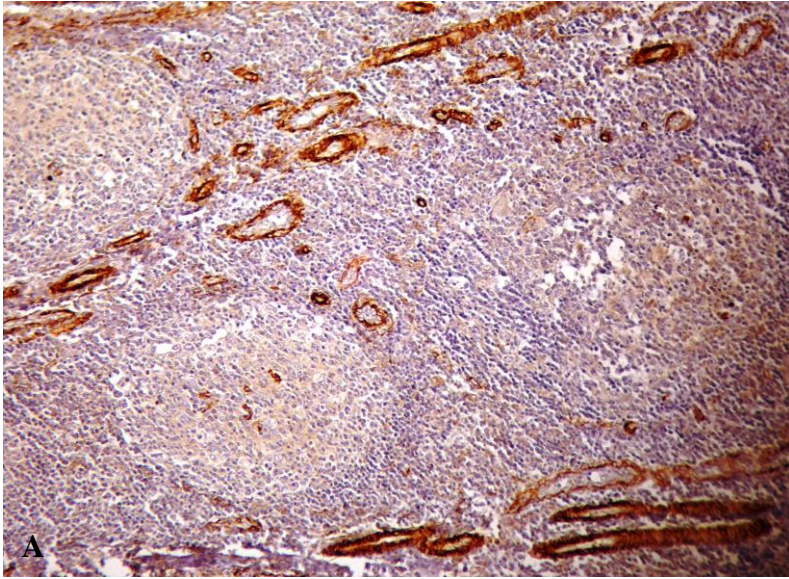


**Figura 10:** **A)** Fotomicrografia do folículo ovariano vitelogênico de *E. perditus*. (HE). Aumento de 630x. **B)** Fotomicrografia do folículo ovariano vitelogênico de *U. vautieri*. Camada da teca abundante em fibras colágenas. Aumento de 1150x. (Tricrômico de Mallory). Camada teca (T), Camada da granulosa (G), zona pelúcida (Z→), vasos sanguíneos (V) e grânulos de vitelo (gv).

### **5.2.2 - Imunolocalização de proteínas do citoesqueleto nos ovários**

Não foi detectada coloração de fundo (background) nas secções de ovário utilizadas como controle negativo. Nos cortes histológicos utilizados como controle positivo ocorreu imunolocalização para alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina (Figs. 11A-C).





**Figura 11:** **A)** Controle positivo para alfa-actina de músculo liso - células endoteliais de vasos sanguíneos. Em órgão linfoide. Aumento de 300x. **B)** Controle positivo para desmina - Músculo estriado esquelético e músculo liso na túnica média da artéria muscular. Aumento de 300x. **C)** Controle positivo para vimentina – músculo estriado cardíaco. Aumento de

Para descrever a intensidade relativa da imunolocalização de alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina nos ovários dos lagartos *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* utilizou-se do sistema de cruces (-) ausente, (++) moderada e (+++) acentuada (Tabela 3).

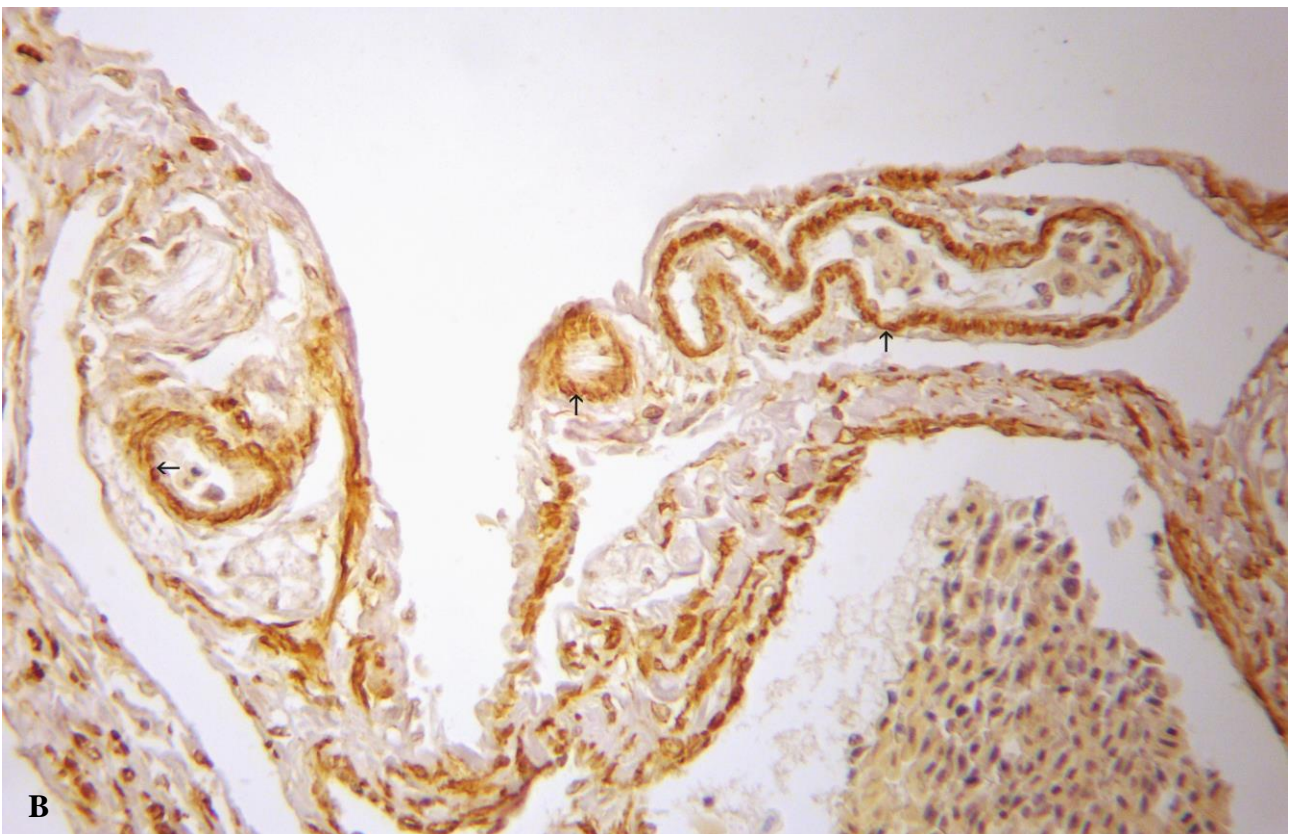
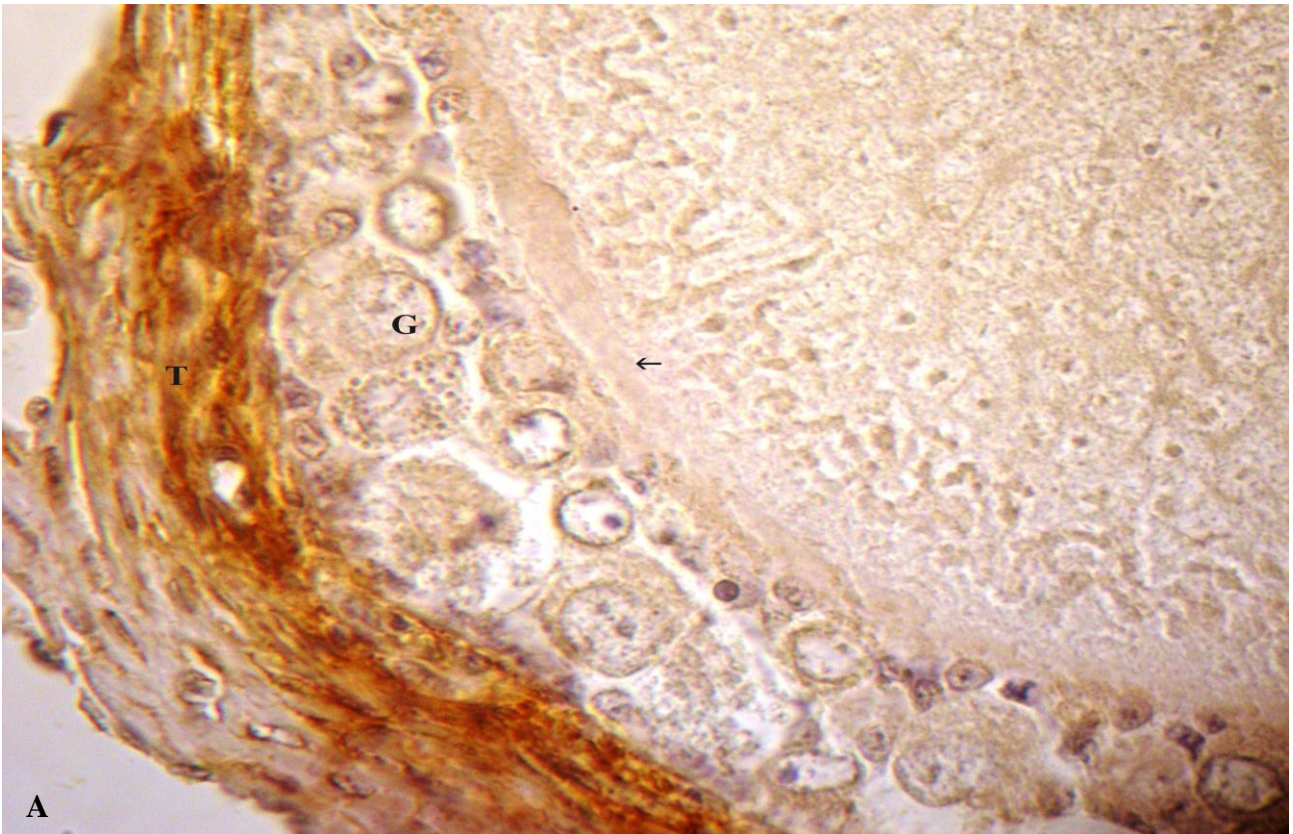
**Tabela 3.** Intensidade relativa da imunolocalização nos ovários dos leiosaurídeos analisados.

	<i>E. perditus</i>	<i>E. bilineatus</i>	<i>U. vautieri</i>
Alfa-actina	+++	+++	+++
Desmina	+++	+++	+++
Vimentina	-	-	-

(-) Ausente (++) moderada e (+++) acentuada.

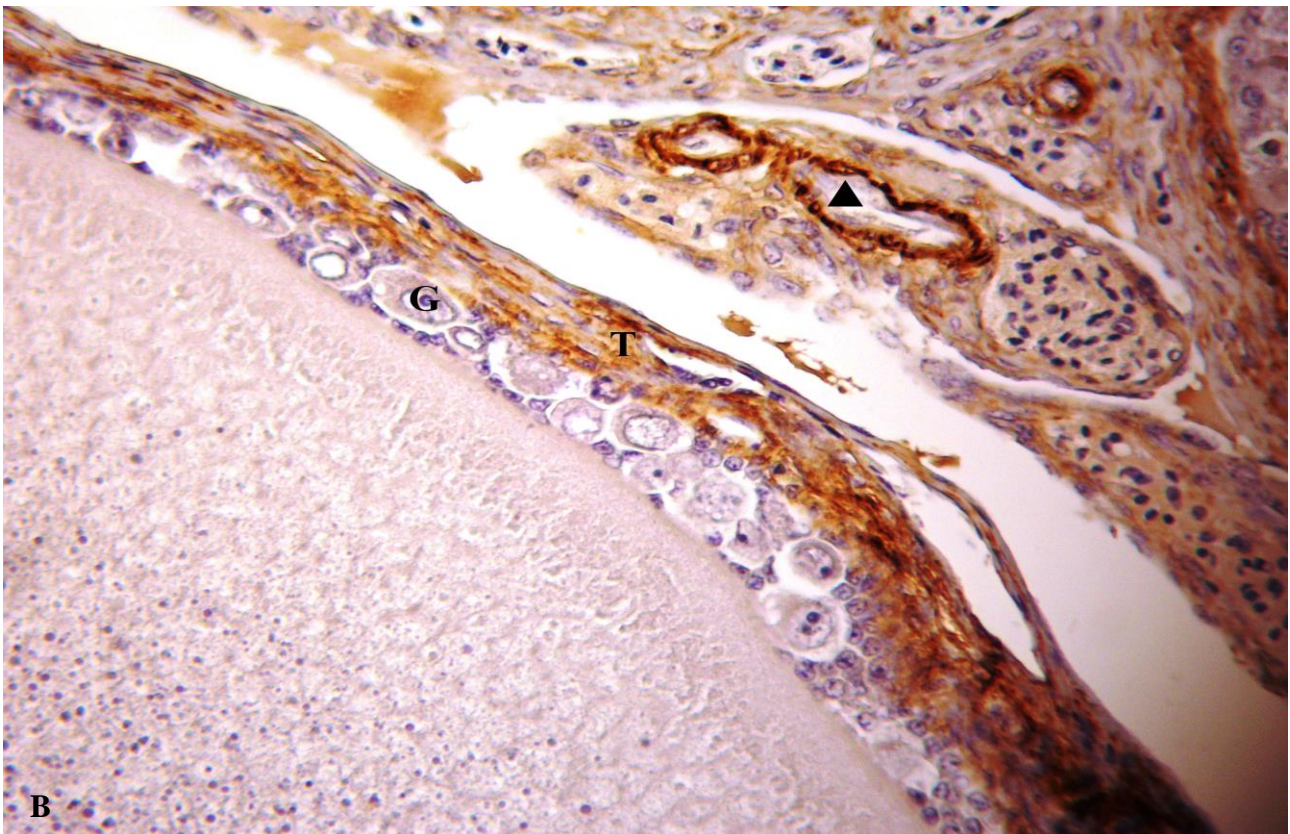
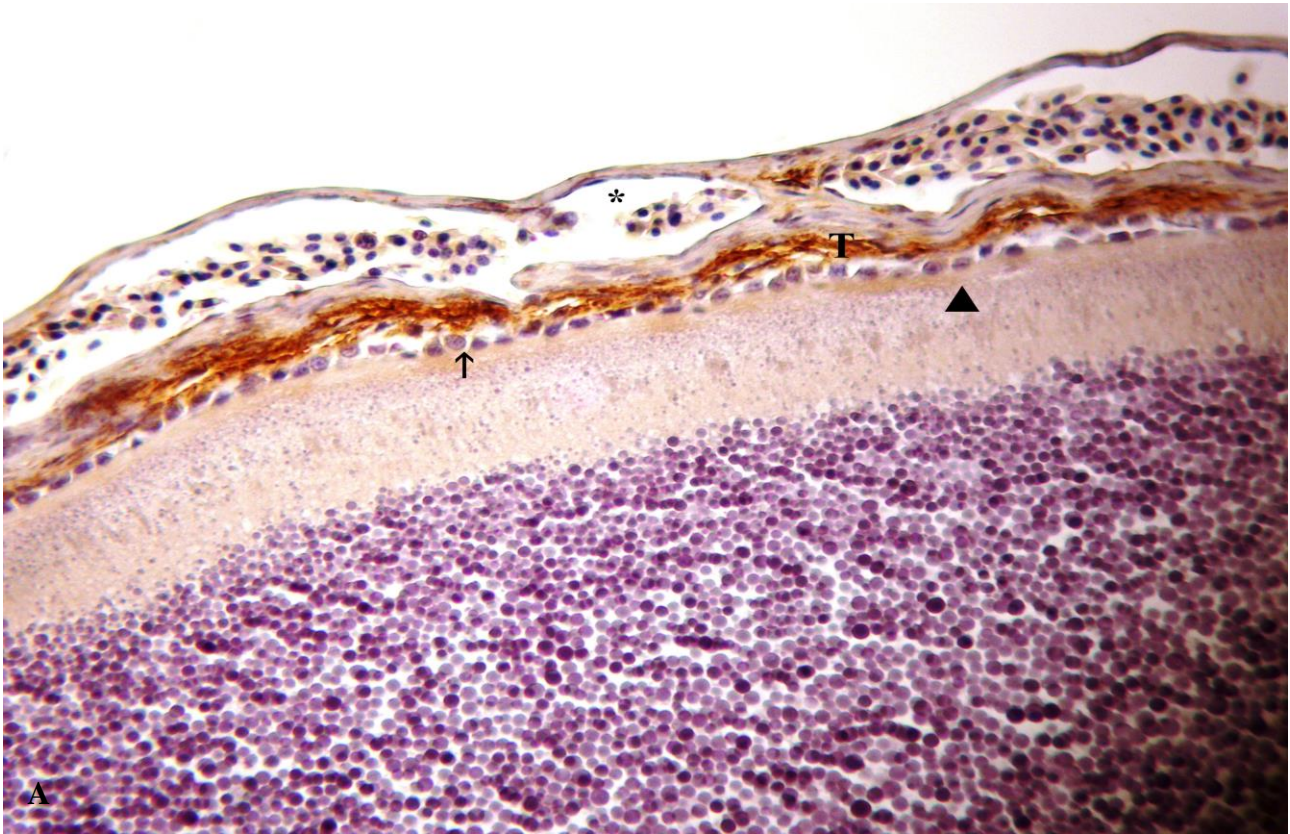
Nos três lagartos analisados foi verificada imunomarcção moderada a acentuada para microfilamentos (MFs) de alfa-actina de músculo liso ao longo da camada da teca e também em células endoteliais dos vasos sanguíneos (Figs. 12, 13 e 14). Não ocorreu imunomarcção nas células da camada granulosa.





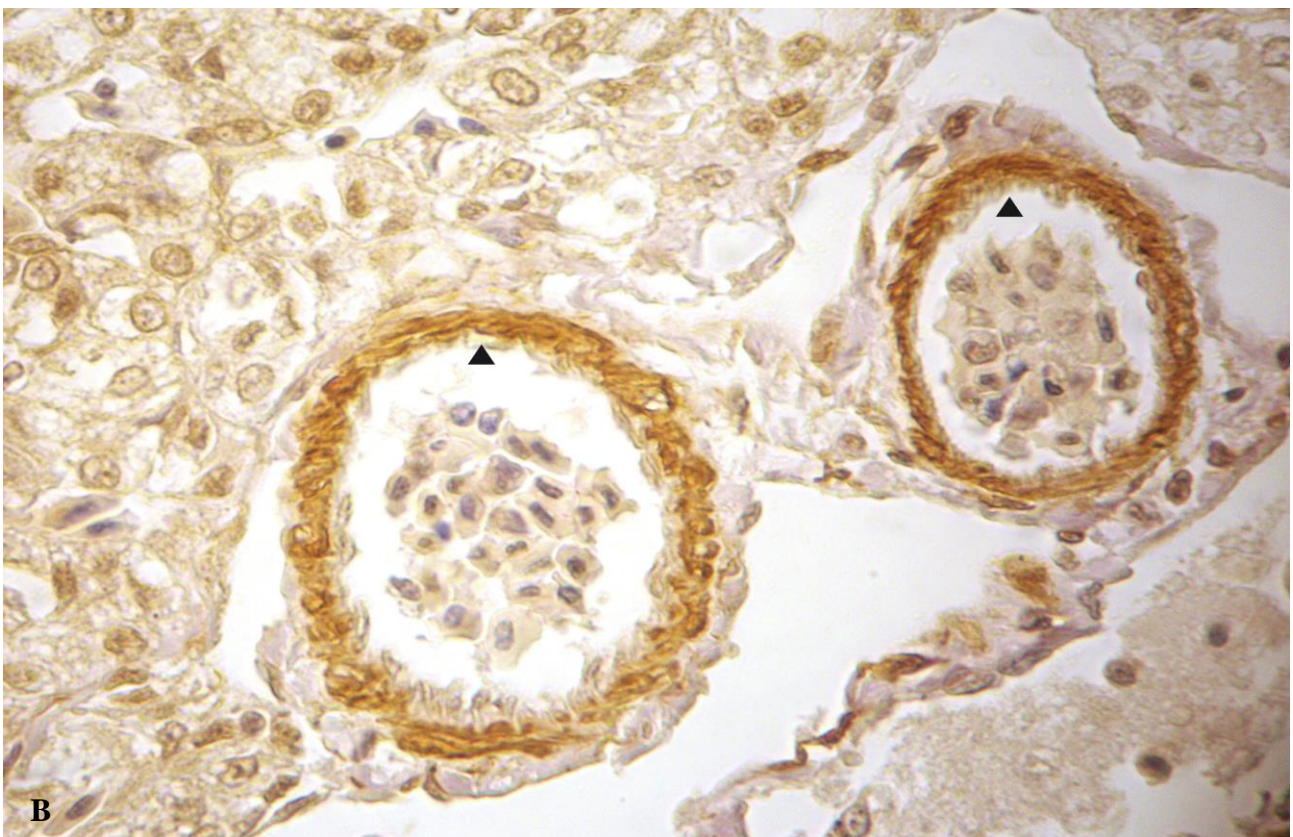
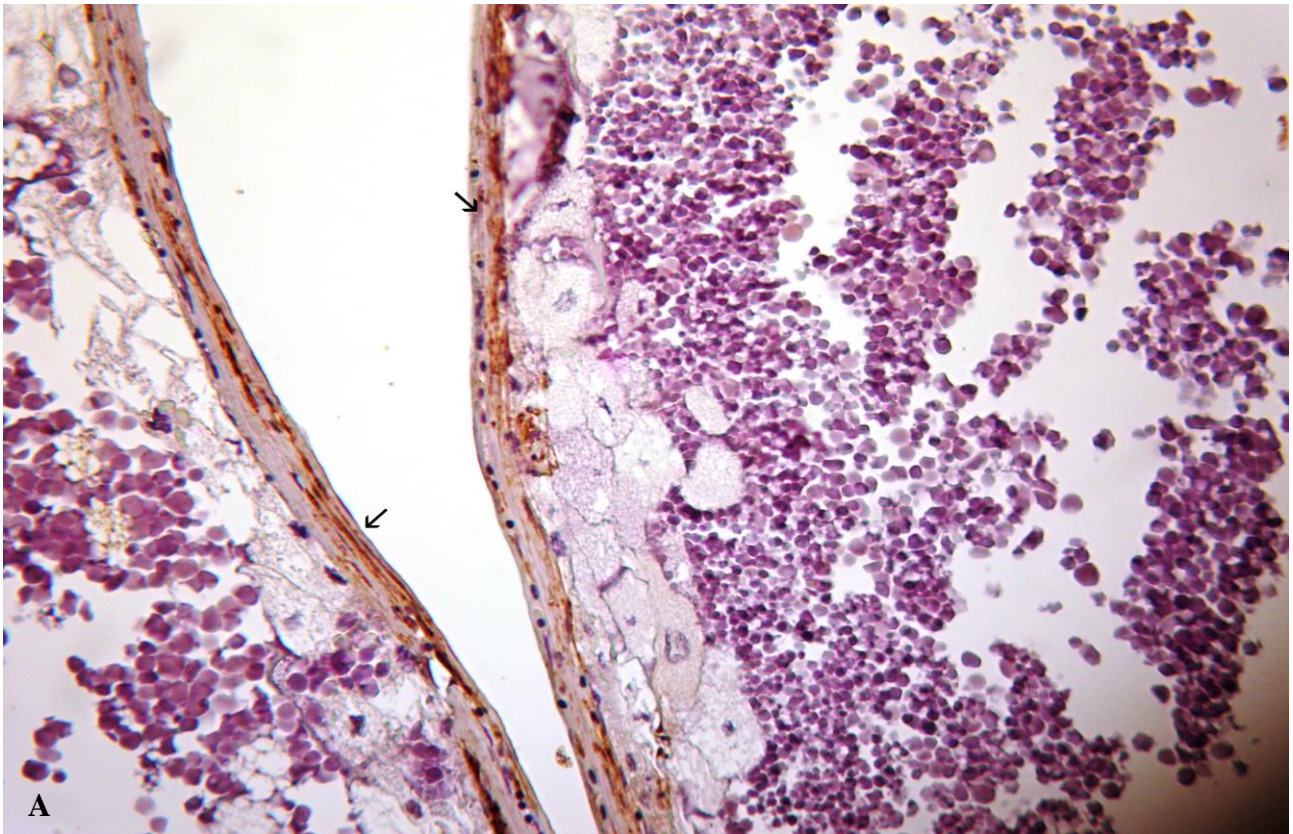
**Figura 12:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus* com imunorreação para alfa-actina na região da teca. Observe ausência de reação na zona pelúcida e a granulosa. Aumento de 630x. (T) camada Teca, (G) camada granulosa e (↑) zona pelúcida. **B)** Fotomicrografia do ovário de *E. bilineatus* . Note a reação imuno-histoquímica positiva nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. (↑) endotélio dos vasos sanguíneos. Aumento de 630x.





**Figura 13:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Em destaque, a reação imuno-histoquímica positiva para alfa-actina na região da teca no folículo ovariano. Note que a zona pelúcida e a camada granulosa não reagiram para este anticorpo. (T) camada teca, (↑) granulosa e (▲) zona pelúcida. Aumento de 630x. **B)** Fotomicrografia do ovário de *E. perditus*. Em evidência a imunomarcacão para alfa-actina na teca e no endotélio dos vasos sanguíneos. (▲) endotélio dos vasos sanguíneos, (T) Teca e (G) granulosa. Aumento de 630x.

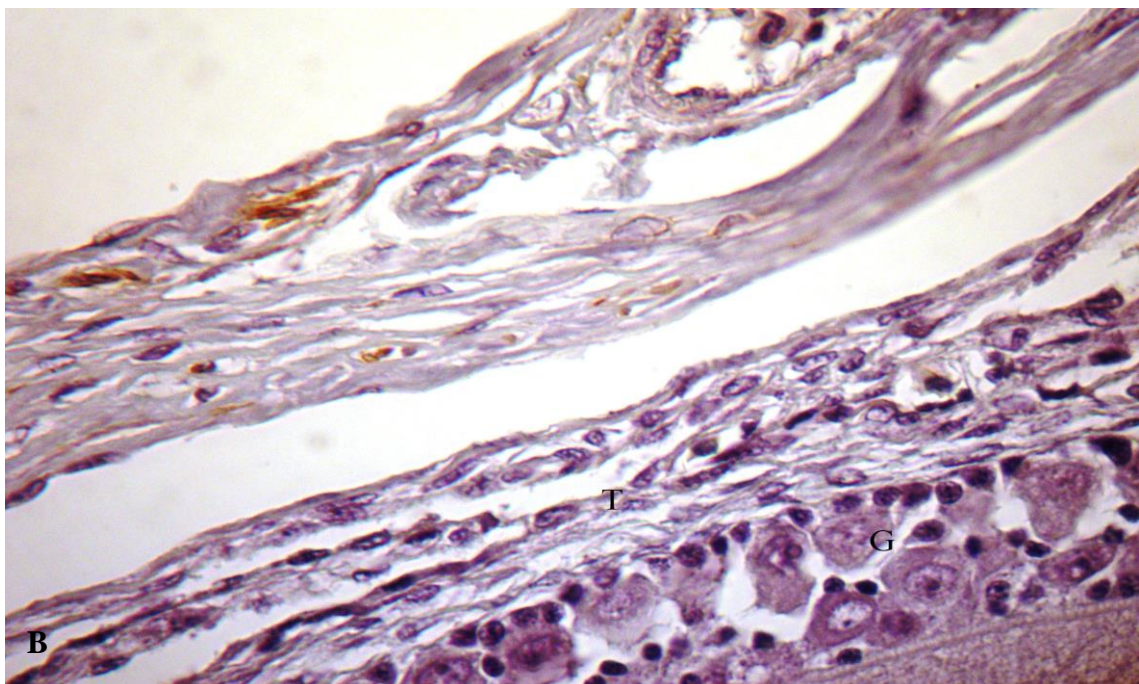
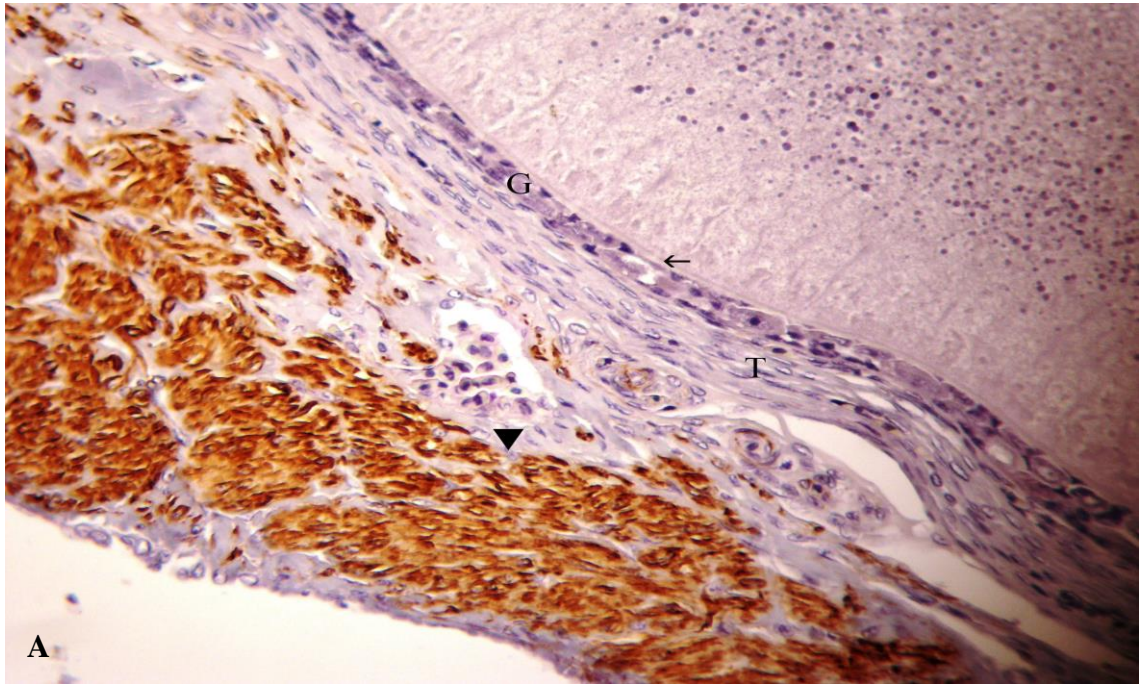




**Figura 14:** **A)** Fotomicrografia do ovário de *U. vautieri* evidenciando a reação imuno-histoquímica positiva para alfa-actina em filamentos na região da teca, em um folículo ovariano. (↑) camada teca. Aumento de 630x. **B)** Fotomicrografia do ovário de *U. vautieri* mostrando a imunorreação para alfa-actina no endotélio dos vasos sanguíneos no estroma ovariano(▲). Não contra corado. Aumento de 1150x.

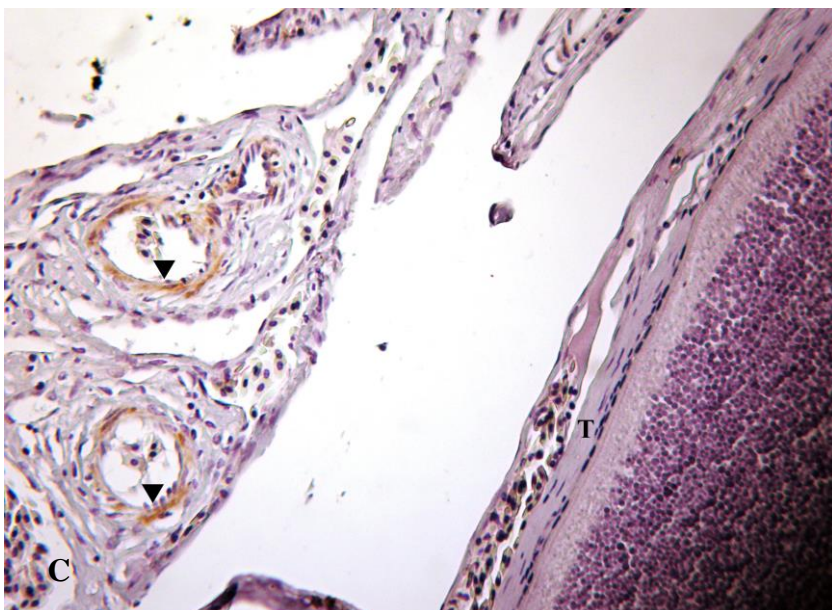
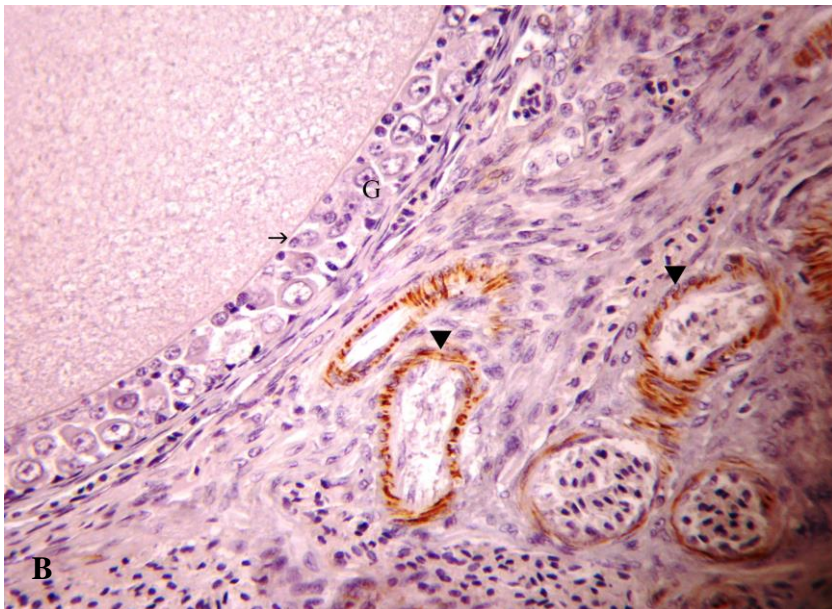
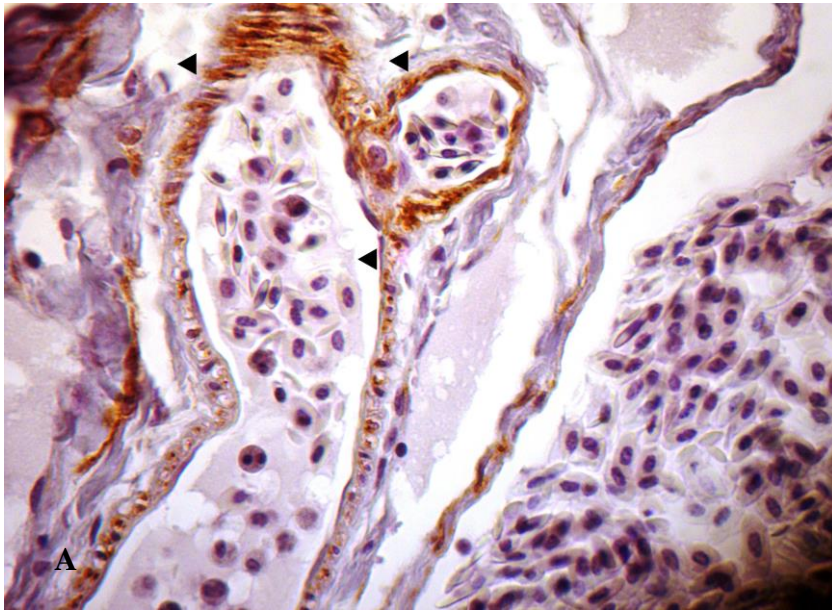


Ao analisar o resultado imuno-histoquímico referente ao filamento intermediário (FI) desmina, apenas em *E. perditus*, foi possível verificar uma acentuada imunomarcagem em fibras musculares na albugínea e no estroma ovariano (Figs. 15A e 15B). Em *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri*, foi constatada uma reação ao anticorpo anti-FI desmina, em células endoteliais nos vasos sanguíneos (Figs. 16A-C). No entanto, a reação foi negativa na teca, nas células da granulosa e na zona pelúcida.



**Figura 15:** A) Fotomicrografia dos ovários de *E. perditus* evidenciando a imunomarcagem para o FI desmina nas fibras musculares. (G) granulosa, (T) teca, (→) zona pelúcida e (▼) fibras musculares. Aumento 630x. B) Fotomicrografia dos ovários de *E. bilineatus*. Notar a ausência de reação imuno-histoquímica para a desmina, nas fibras musculares, teca e granulosa. (▼) fibras musculares, (T) teca e (G) granulosa. Aumento 1150x.

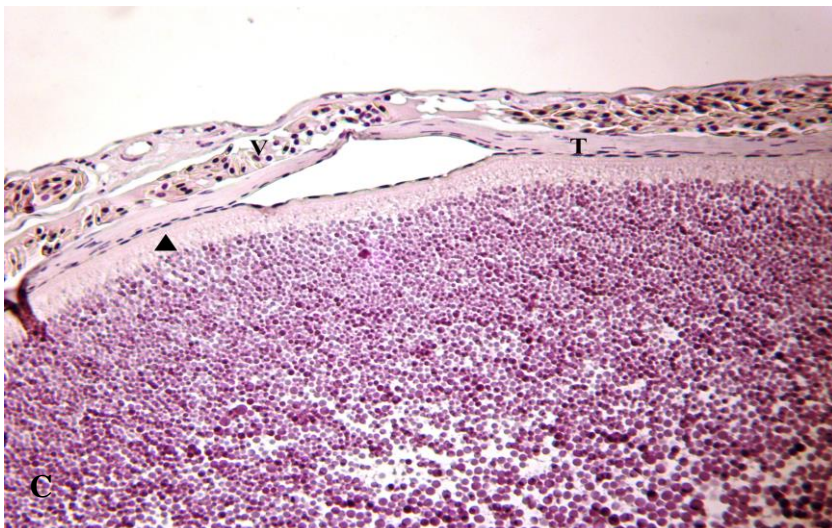
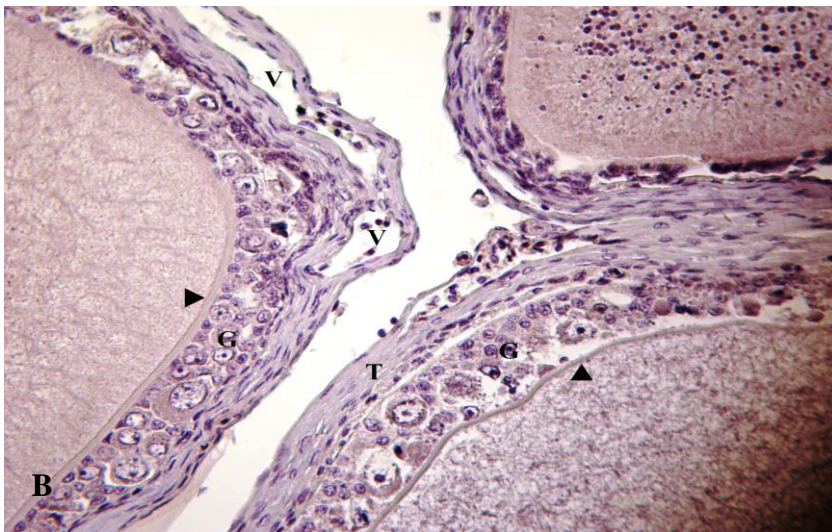
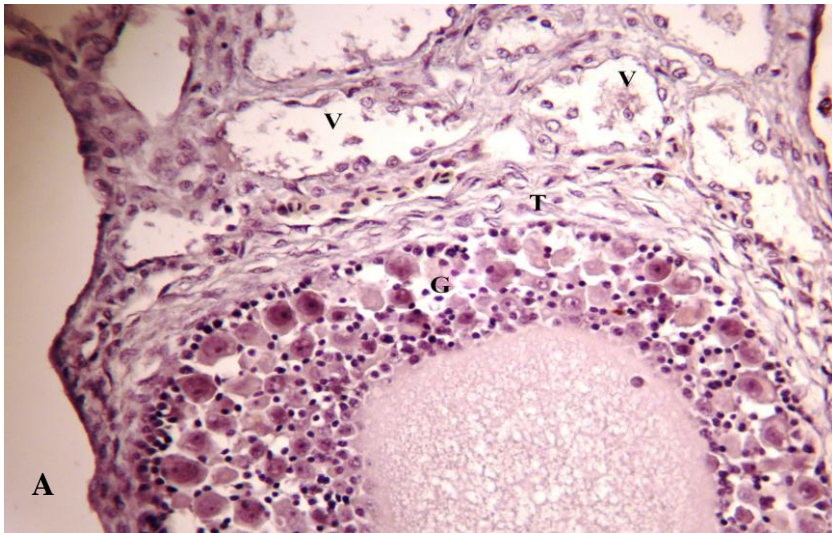




**Figura 16:** Fotomicrografias dos ovários de (A) *E. bilineatus*, (B) *E. perditus* e (C) *U. vautieri*. Notar a reação imuno-histoquímica positiva para a desmina nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. A) aumento de 1150x, B) e C) aumento de 630x. (G) camada granulosa, (T) teca, (→) zona pelúcida e (▼) endotélio vasos sanguíneos.



Não houve imunomarcacão para a vimentina, com o clone utilizado, em todos os lagartos e órgãos estudados (Figs.17A-C). No entanto, a eficácia do anticorpo utilizado foi demonstrada em células endoteliais de vasos sanguíneos no tecido utilizado como controle positivo.



**Figura 17:** Fotomicrografias dos ovários de (A) *E. perditus*, (B) *E. bilineatus* e (C) *U. vautieri*. Destaque para ausência de reação imunohistoquímica para o FI vimentina. (G) granulosa, (V) vasos sanguíneos, (T) teca e (▶) zona pelúcida. A) Aumento de 300x. B) e C) Aumento de 630x.

## 5.3 - DISCUSSÃO

### 5.3.1 - Estudo histológico dos ovários

Os três lagartos da família Leiosauridae analisados apresentam ovários e dois ovidutos pareados, funcionalmente ativos, similar ao descrito em outros répteis (Noble & Noble, 1940; Baroudi, 1970; Sandleir, 1973; Storer *et al*, 2000). Resultado diferente do observado em aves as quais possuem apenas o lado esquerdo do aparelho reprodutor feminino desenvolvido e o lado direito rudimentar (Ellenport, 1986; Dyce *et al*, 1997; Bakst, 1998).

Em fêmeas de lagartos tropicais, existe variação no ciclo reprodutivo correlacionada com parâmetros ambientais, como temperatura, fotoperíodo e precipitação pluviométrica. Ferreira (2001) relatou que em espécies de leiosaurídeos o período reprodutivo está associado principalmente à estação chuvosa. Entretanto em outros répteis, os processos de ovogênese e a foliculogênese seguem um padrão bem definido (Ferreira, 2001; Grier *et al.*, 2016).

Com a análise histológica dos ovários de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* observou-se que estes são revestidos por epitélio cúbico simples, com uma camada subjacente, a túnica albugínea, assim como o descrito em outros répteis por Guraya (1989). No córtex ovariano destes lagartos foram observados folículos ovarianos, que são a unidade básica do sistema reprodutor feminino, em diferentes estágios de desenvolvimento. Os folículos ovarianos consistem em um ovócito envolvido pela zona pelúcida, camadas da granulosa e teca, esta composta por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células secretoras. Este resultado é semelhante ao observado em um Squamata por Vieira *et al.* (2010) e em um crocodilo, por Machado-Santos *et al.* (2015). No estroma ovariano destes lagartos, existem pequenos feixes de fibras musculares lisas que podem estar envolvidos na atividade contrátil durante a foliculogênese e ovocitação (De Pérez *et al.*, 1999). Esta característica também foi observada em outros reptilianos (Jones, 1987; Uribe & Guillette, 2000; De Pérez & Ramírez, 2002) e em aves (Guraya, 1989).

No ovário de répteis ovíparos e ovovivíparos, a foliculogênese é um processo caracterizado por alterações fisiológicas e morfológicas no ovócito, principalmente com a deposição de vitelo no citoplasma, bem como nas células da camada da granulosa e na camada da teca (Van Sluys *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006; Manes *et al.*, 2007; Moodley & Van Wyk, 2007).

Em répteis, como em todos os vertebrados, ocorre a produção de hormônios esteroides nos ovários que é essencial para que ocorra a foliculogênese, bem como para a manutenção das funções desempenhadas pelo sistema reprodutor (Botte & Angelini, 1980, Norris & Jones, 2012). A produção destes hormônios nas gônadas, em fêmeas e em machos, está ligada ao eixo hipotálamo-hipófise através do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e está sob seu controle com “feedback” positivo e/ou negativo que regula a concentração plasmática destes hormônios (Botte & Angelini, 1980, Norris & Jones, 2012).

Através de análise histológica foi possível identificar nos ovários dos lacertílios *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri*, folículos pré-vitelogênicos e folículos vitelogênicos, conforme foi descrito em outros lagartos ovíparos (Sadjia *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2015), bem como em outros répteis (Uribe & Guillete, 2000; De Pérez & Ramírez, 2002).

No estágio pré-vitelogênico foi possível diferenciar três tipos de células na granulosa, que também foram verificados em outros répteis (Van Wyk, 1984; Guraya, 1989; Andreuccetti, 1992; Motta *et al.*, 1995, 1996; Uribe *et al.*, 1995, 1996; Hernandez-Franyutti *et al.*, 2005, Tumkiratiwong *et al.*, 2012). Na tartaruga *Pseudemys scripta elegans*, foram verificados apenas dois tipos celulares na granulosa, durante a pré-vitelogênese (Rahil & Narbaitz, 1973).

Em répteis, a origem de células da granulosa, como morfologia distinta durante a foliculogênese tem sido amplamente questionada. Boyd (1940) e Betz (1963), afirmam que as células intermediárias e grandes se diferenciam individualmente das células pequenas. Outros sugerem que as células grandes são derivadas das intermediárias, que por sua vez são derivadas das células pequenas (Neaves, 1971; Van Wyk, 1984; Andreuccetti, 1992; Motta *et al.*, 1996; Loredana *et al.*, 2004).

A função das células da granulosa está relacionada à permeabilidade, ou seja, selecionam substâncias externas transportadas pelos vasos sanguíneos (Uribe *et al.*, 2000). Elas também estão envolvidas no transporte de precursores, como a vitelogenina, que formarão a gema do ovócito (Neaves, 1971; Uribe *et al.*, 1995, 1996; Hernández-Franyutti *et al.*, 2005). Além disso, estas células da granulosa ainda são importantes na síntese do hormônio estradiol que exerce ação autócrina e parácrina nos folículos pré-vitelogênicos (Van Sluys *et al.*, 2004; Sadjia *et al.*, 2007; Hammouche *et al.*, 2009). O estradiol é essencial para a produção hepática de vitelogenina e para o desenvolvimento de ovidutos (Sadjia *et al.*, 2007).

Nas espécies analisadas, a zona pelúcida foi identificada, através das técnicas histológicas e histoquímicas utilizadas, por uma camada única. Este resultado difere ao descrito em outros répteis nos quais a zona pelúcida foi diferenciada em duas subcamadas (Goldberg, 1970, 1973; Uribe *et al.*, 1996; Uribe & Guillette, 2000; Hernandez-Franyutti *et al.*, 2005; Moodley & Van Wyk, 2007; Perez-Bermudez *et al.*, 2012).

Nos lacertílios investigados, ao redor da camada da granulosa encontra-se a camada da teca, a qual não é possível diferenciar em regiões. O mesmo resultado foi descrito em outros répteis (Van Wyk, 1984; Moodley & Van Wyk, 2007, Machado-Santos *et al.*, 2015). Entretanto, diferente resultado foi relatado em *Hoplodactylus maculatus* (Boyd, 1940), *Natrix rhombifera* (Betz, 1963) e em *Podarcis s. sicula* (Raucci & Di Fiore, 2010) nos quais a teca é subdividida em camada interna celular e externa fibrosa.

No estágio vitelogênico, no citoplasma dos ovócitos de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* observa-se inúmeros vacúolos pequenos que crescem e se fundem. Este resultado também foi observado em outros répteis (Van Wyk, 1984; Hubert, 1985; Uribe *et al.*, 1995). De acordo com Guraya (1989), a presença deste tipo de folículo é utilizada na determinação o estado reprodutivo da fêmea de lagartos e ajuda na definição do ciclo reprodutivo de uma espécie.

No presente trabalho, como todos os espécimes analisados de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* fazem parte de uma coleção herpetológica, não foi possível realizar um acompanhamento prévio na natureza e informar dados sobre a atividade reprodutiva destes lagartos. Porém, recentemente foram divulgados dados sobre a biologia reprodutiva de fêmeas de *E. perditus* e *E. iheringii* provenientes de coleções científicas, de cativeiro e de coletas em campo (Migliore, 2016). Neste estudo foi descrito pela primeira vez registros de estocagem de espermatozoides em fêmeas do gênero *Enyalius*. Além disso, foi relatado que as fêmeas de *E. perditus* possuem o ciclo reprodutivo acíclico e provavelmente sincronizado e altamente sazonal, concentrado na estação chuvosa e as fêmeas de *E. iheringii* possuem o ciclo mais estendido que as de *E. perditus*, fato possivelmente favorecido pela estocagem de espermatozoides observado no oviduto desta espécie.

### 5.3.2 - Imunolocalização de proteínas do citoesqueleto nos ovários

As proteínas do citoesqueleto, alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina investigadas nos ovários dos lagartos *E. perditus*, *E. bilineatus* e *U. vautieri* apresentam um papel relevante para o organismo, atuando em diversos órgãos. Galou *et al.*, (1997) demonstraram que a presença de certas proteínas do citoesqueleto, pode ser usada para identificar diferentes tipos de células. Sabe-se que a desmina e vimentina constituem um componente essencial do citoesqueleto. Além disso, estes filamentos intermediários (FIs) estão envolvidos em várias atividades celulares, como diferenciação, proliferação e união célula a célula (Helfand *et al.*, 2003).

Os microfilamentos (MFs) de alfa-actina de músculo liso são específicos apenas para células musculares lisas (Skalli *et al.*, 1986; Paulin & Li, 2004). O arranjo destas células nos ovários forma um quadro estrutural, que fornece suporte mecânico para os mesmos (Van Nassauw *et al.*, 1989). A alfa-actina do músculo liso tem um papel extremamente relevante na diferenciação e no apoio estrutural destas células do músculo liso (Goldman *et al.*, 1996; Galou *et al.*, 1997).

Ao analisar os ovários de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* constatou-se a presença de MFs de alfa-actina de músculo liso na camada da teca, nos folículos ovarianos. Este resultado também foi verificado em algumas espécies de aves, como em codornas japonesas (Van Nassauw *et al.*, 1989; Van Nassauw & Callebaut, 1991). Van Nassauw *et al.*, (1992) relataram que as células da teca nesta espécie possuem propriedades ultraestruturais similares à células musculares lisas. Contudo, na galinha doméstica estudos ultraestruturais de folículos ovarianos têm identificado estas células como fibroblastos (Rothwell & Solomon, 1977; Perry *et al.*, 1978). Estes demonstraram ter uma capacidade contrátil, característica importante durante a ovocitação (Yoshimura *et al.*, 1983).

Em algumas espécies de aves, a presença de alfa-actina de músculo liso foi demonstrada no cortéx e em células do músculo liso da camada da teca, mostrando assim que este microfilamento pode apresentar um papel estrutural para o ovário (Madekurozwa & Kimaro, 2006; Madekurozwa, 2007).

Inicialmente se pensava que a desmina era uma proteína específica dos músculos esquelético, liso e músculo cardíaco. Contudo, a imunorreatividade da desmina tem sido

observada em vários tipos de células, incluindo em adipócitos e no fígado (Yokoi *et al.*, 1984).

A imunorreação positiva para desmina na albugínea e no estroma ovariano dos lagartos estudados é semelhante ao resultado descrito por Callebaut & Van Nassauw (1987) na tartaruga *Pseudemys scripta elegans*, os quais citam a presença de células mióides nestes tecidos. Nenhuma reação foi observada na camada granulosa e na camada da teca. Em algumas espécies de mamíferos, na camada da teca também não foi detectada reação positiva para desmina, como no babuíno (Khan-Dawood *et al.*, 1996) e na vaca (Van den Hurk *et al.*, 1995). Em contraste, células da teca dos folículos ovarianos de ratas (Selstam *et al.*, 1993) e ovelhas (Marettova & Marett, 2002) exibiram reação positiva para a desmina. Estes achados indicam que este tipo de imunorreação é dependente da espécie analisada.

Além de serem observados ao longo dos tecidos ovarianos, os filamentos de desmina e alfa-actina de músculo liso, também foram demonstrados em células endoteliais de vasos sanguíneos em todo o ovário, nas três espécies de lagartos investigados. Estes achados estão de acordo com os resultados obtidos em tartarugas (Van Nassauw *et al.*, 1991), em codornas japonesas (Van Nassauw & Callebaut, 1991; Van Nassauw *et al.*, 1992), em ratas (Selstam *et al.*, 1993), na vaca (Van den Hurk *et al.*, 1995) e em ovelhas (Redmer *et al.*, 2001, Marettova & Marett, 2002). A presença de desmina e actina de músculo liso em vasos sanguíneos sugere que estes filamentos citoesqueléticos têm um papel fundamental na regulação do fluxo sanguíneo, através dos ovários.

Nos ovários nos lagartos investigados não ocorreu imunomarcção para vimentina. A ocorrência de imunorreatividade para vimentina em ovário é bastante variável, tendo sido verificada em células da camada granulosa e em células endoteliais nos vasos sanguíneos de suínos (Czernobilsky *et al.*, 1985), de primatas (Khan-Dawood *et al.*, 1996), em ovelha (Marettova & Marett, 2002), em avestruz (Madekurozwa & Kimaro, 2006) e em emu (Madekurozwa, 2007) e ainda no epitélio ovariano de avestruz (Madekurozwa & Kimaro, 2006), do emu (Madekurozwa, 2007) e de primatas (Czernobilsky *et al.*, 1985; Khan-Dawood *et al.*, 1996).

## 5.4 - CONCLUSÕES

- Em conclusão, os ovários de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* são órgãos pares e morfológicamente ativos.
- Os ovários apresentam folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, podendo ser identificados folículos pré-vitelogênicos e vitelogênicos.
- A imuno-histoquímica para alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina nos ovários destes leiosaurídeos identificam variações entre as espécies.
- A imunorreação foi mais acentuada para o microfilamento alfa-actina de músculo liso, enquanto entre os filamentos intermediários, a desmina foi acentuadamente positiva e a vimentina mostrou resultados negativos.
- Estudos descritivos sobre a reprodução de répteis têm fornecido dados essenciais para formular e testar diversas hipóteses de história de vida. Deste modo, são necessárias mais investigações sobre a morfologia geral do sistema reprodutor de Squamatas, principalmente entre os lagartos tropicais, para elucidar ainda mais as tendências na evolução deste sistema e as suas funções.
- Esses resultados auxiliam a compreender como estas espécies se comportam, pois embora a reprodução não seja crucial para a sobrevivência de um indivíduo, a mesma é essencial para permanência de uma espécie.



## Capítulo II

### **Estudo histológico e localização imuno-histoquímica de proteínas do citoesqueleto em testículos e epidídimos de três espécies de lagartos da família Leiosauridae (Reptilia: Squamata)**



## Resumo

Este trabalho investiga, além da descrição histológica, a presença e distribuição imuno-histoquímica de alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina nos testículos e epidídimos de *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* e *Urostrophus vautieri*, representantes da família Leiosauridae, para ajudar a formar uma base de dados sobre a biologia reprodutiva destes lagartos que possam ser comparados com outras espécies de répteis, bem como com outros vertebrados. Os espécimes estudados encontram-se depositados na Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os epidídimos e testículos dos animais foram removidos e encaminhados ao Laboratório de Histologia e Embriologia (UFRRJ), onde foram fixados, processados e então submetidos às técnicas histológicas e imuno-histoquímicas. O formato dos testículos varia razoavelmente entre os leiosaurídeos estudados. Estes órgãos encontram-se envoltos pela túnica albugínea e no seu interior contém septos que formam lóbulos incompletos, nos quais se localizam os túbulos seminíferos. Os epidídimos destes lagartos são ductos convolutos. Estes ductos são revestidos internamente por um epitélio que varia de cilíndrico simples a cúbico simples com estereocílios. A imuno-histoquímica revela uma acentuada reação positiva para alfa-actina de músculo liso nos testículos dos leiosaurídeos analisados, na túnica albugínea e no tecido intersticial, assim como, nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. A desmina apresentou acentuada imunorreatividade na albugínea testicular em *E. bilineatus* e moderada em *E. perditus* e *U. vautieri*, entretanto, na região do tecido intersticial, apenas em *E. bilineatus* ocorreu imunomarcção. Nas três espécies analisadas, as células endoteliais dos vasos sanguíneos demonstraram imunorreação positiva para desmina. Nos epidídimos observou-se reação imuno-histoquímica moderada para alfa-actina de músculo liso na cápsula e no tecido intersticial, enquanto a desmina demonstrou imunorreação positiva apenas em *E. perditus* e *E. bilineatus*. Não houve imunomarcção para vimentina nos testículos e epidídimos dos três lagartos analisados. Este estudo obteve resultados consistentes, fornecendo assim mais dados sobre a biologia reprodutiva das espécies aqui investigadas, que poderão ser utilizados para comparações filogenéticas e comportamentais com outras espécies da família Leiosauridae e outros répteis.

**Palavras Chave:** Imunorreação, répteis, microfilamentos, filamentos intermediários.

## **Abstract**

The aim of the current study is to investigate the histological description, as well as the presence and immunohistochemical distribution of alpha smooth muscle actin, desmin and vimentin in the testes and epididymis of *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* and *Urostrophus vautieri*, which are representatives of family Leiosauridae, in order to help developing a database on the reproductive biology of these lizards, which could be compared to that of other reptile species and vertebrates. The herein studied specimens are deposited in the Herpetological Collection of Federal University of Juiz de Fora. The animals' epididymis and testes were removed and sent to the Histology and Embryology Laboratory (UFRRJ), where they were fixed, processed and then subjected to histological and immunohistochemical techniques. The shape of the testes varies reasonably among the studied leiosauridae. These organs are covered by the tunica albuginea and hold septa forming lobes, where the seminiferous tubules are located in. The epididymis of these lizards are convolute ducts internally coated by an epithelium, whose shape ranges from simple cylindrical to simple cubic with stereocilia. The immunohistochemical analysis applied to the testes of the herein studied lizards showed strong positive reaction to the alpha smooth muscle actin in the tunica albuginea, interstitial tissue, and in endothelial cells of blood vessels. Desmin showed strong immunoreactivity in the testicular albuginea of *E. bilineatus* and moderate immunoreactivity in *E. perditus* and *U. vautieri*; however, only *E. bilineatus* showed immunostaining in the interstitial tissue region. The endothelial cells of blood vessels showed positive immunoreaction to desmin in the three herein analyzed species. The epididymis showed moderate immunohistochemical reaction to alpha smooth muscle actin in the capsule and in the interstitial tissue, whereas desmin showed positive immunoreaction in the epididymis of *E. perditus* and *E. bilineatus*, only. Vimentin did not show immunostaining in the testes and epididymis of the three analyzed lizards. The consistent results found in the current study provide additional data on the reproductive biology of the investigated species. These data may be used for phylogenetic and behavioral comparisons between the herein studied species and other species belonging to family Leiosauridae or other reptiles.

**Keywords:** Immunoraction, reptiles, microfilaments, intermediate filaments.

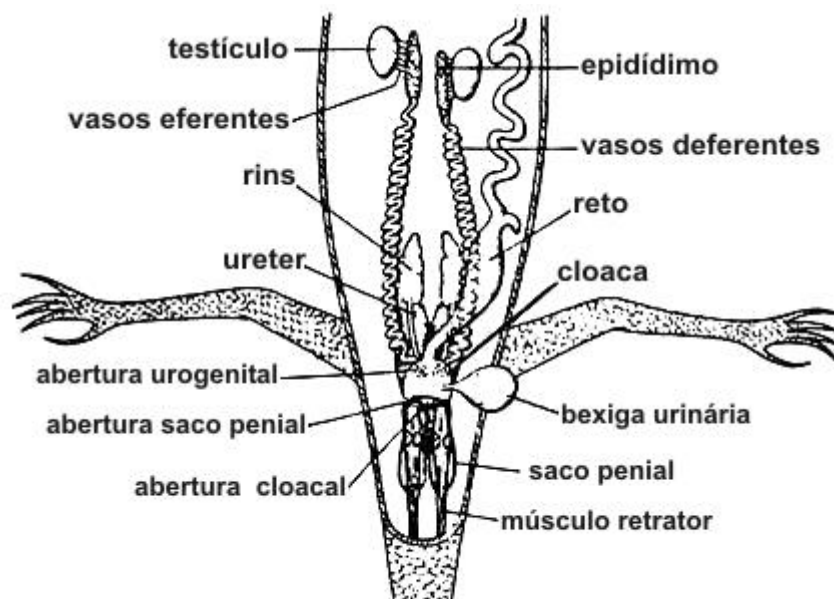
## 6.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a estrutura dos testículos e epidídimos de *Enyalius bilineatus*, *Enyalius perditus* e *Urostrophus vautieri*, através da histologia.
- Identificar glicoproteínas ácidas e neutras nos testículos e epidídimos das três espécies de lagartos estudadas, através de reações histoquímicas específicas.
- Contribuir para o conhecimento sobre a existência e a distribuição de alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina nos testículos e epidídimos de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri*, através do método imuno-histoquímico específico.

## 6.2- RESULTADOS

### 6.2.1 - Estudo histológico dos testículos e epidídimos

Para demonstrar o arranjo dos testículos e epidídimos das espécies de lagartos analisados no presente estudo, foi utilizado um esquema com a representação destes órgãos do aparelho reprodutor masculino de lagartos em geral (Esq. 04).

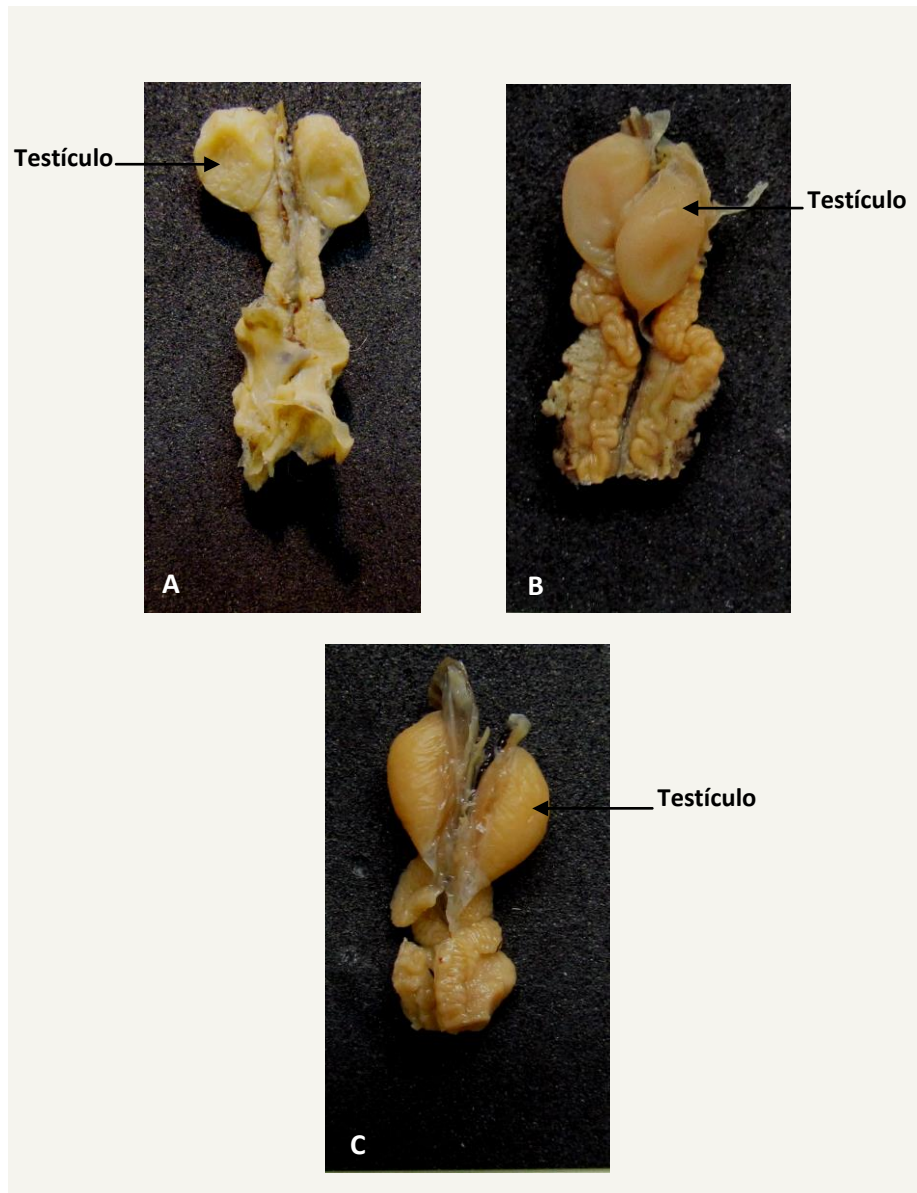


Esquema 04. Representação de órgãos do sistema urogenital masculino de lagartos.

<http://www.biologydiscussion.com/zoology/dissection/dissection-of-garden-lizard-with-diagram-zoology/45189>

Os testículos localizam-se na cavidade pleuroperitoneal, posicionado dorsalmente aos intestinos. O formato dos testículos varia razoavelmente nas espécies estudadas, sendo ovais em *E. bilineatus* e *E. perditus*, enquanto em *U. vautieri* apresenta-se ligeiramente alongado (Figs. 18A-C). Os epidídimos são ductos convolutos, que se estendem dorsalmente aos testículos, desembocando nos vasos deferentes. Juntos, os epidídimos e vasos deferentes são responsáveis pelos processos de armazenamento e condução dos espermatozoides em direção à cloaca. Posteriormente, o canal deferente se junta ao ureter e os dois formam um

duto curto e comum, que se abre na superfície dorsal da cloaca através de um poro na papila urogenital.



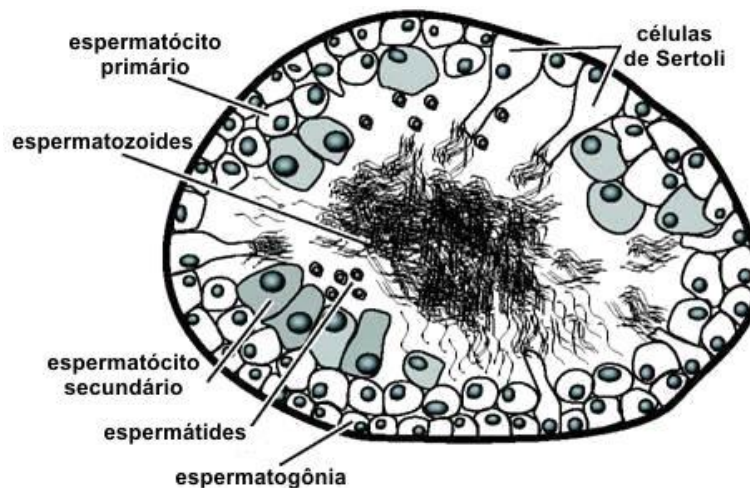
**Figura 18:** Fotos do aparelho reprodutor masculino. A) de *Enyalius bilineatus*. B) de *Enyalius perditus*. C) de *Urostrophus vauieri*.

Histologicamente, os testículos dos lagartos estudados, órgãos responsáveis pela produção dos espermatozoides, encontram-se envolvidos por uma camada de tecido conjuntivo com muitas fibras colágenas, denominada túnica albugínea (Fig. 19). Septos delgados proveniente da albugínea penetram o testículo, dividindo-o em lóbulos testiculares incompletos. No interior destes lóbulos estão os túbulos seminíferos, que são túbulos

enovelados. Desta forma, os testículos destes lagartos podem ser divididos em duas porções: porção tubular e porção intersticial. Entre os túbulos seminíferos existe tecido intersticial, constituído por células e fibras do tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e pelas células intersticiais (células de Leydig) (Fig. 21A).

Na albugínea testicular foi detectada a presença de glicoproteínas neutras, com reação moderada ao PAS (Fig. 20A), porém, esta não reagiu ao Alcian blue (Fig. 20B).

A parede dos túbulos seminíferos é formada por várias camadas de células denominadas epitélio seminífero, no qual, observa-se a presença de células espermatogênicas em diferentes estágios de desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e os espermatozoides) e de células somáticas de Sertoli. Este epitélio é envolvido por uma lâmina basal e por uma bainha de tecido conjuntivo rica em fibroblastos (Esq. 05; Fig. 21B).



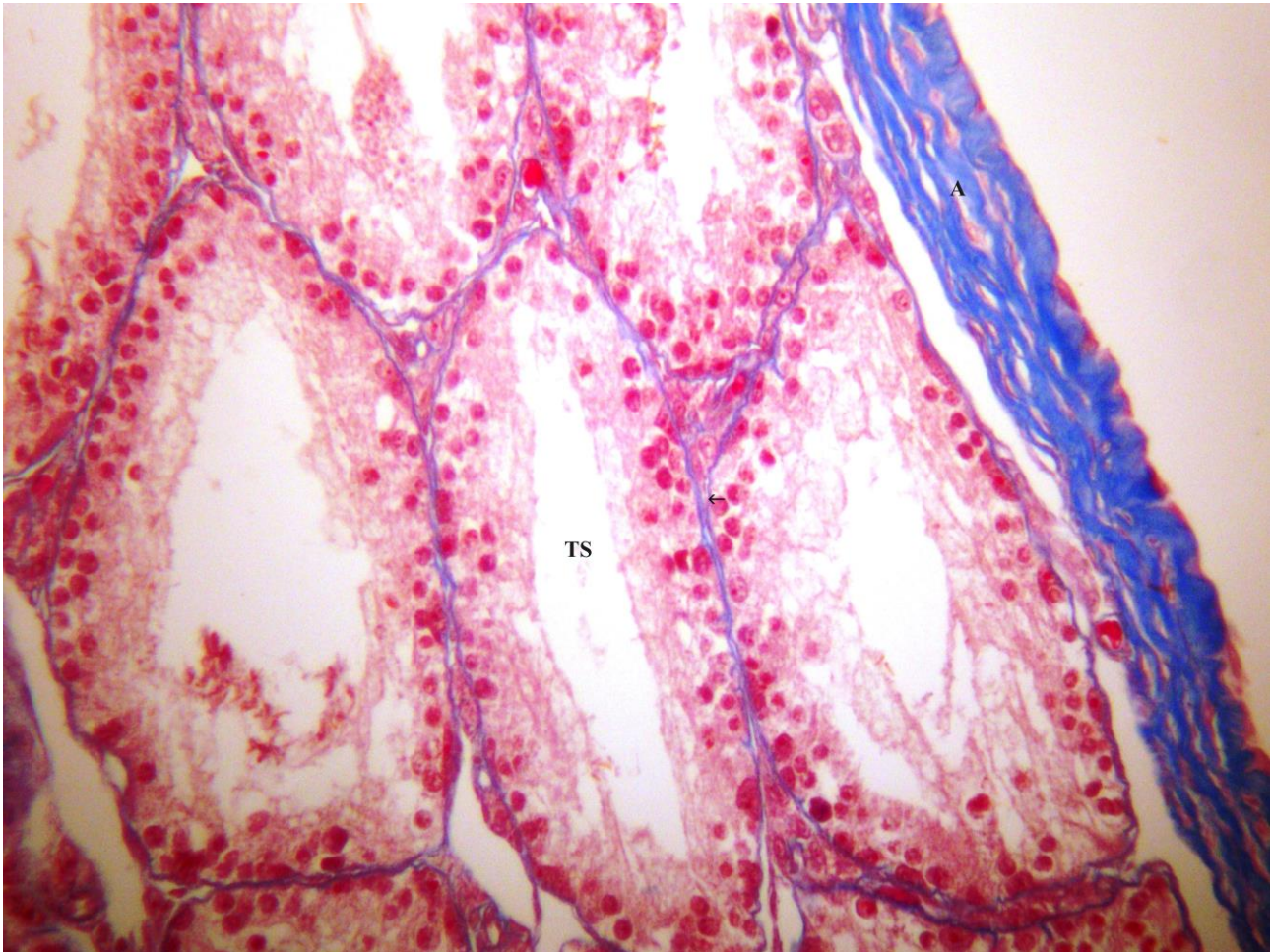
Esquema 05. Representação de uma seção transversal através de um túbulo seminífero em testículo de réptil feito por Zug *et al.* ( 2001).

A análise histológica revelou que os epidídimos das três espécies analisadas são envolvidos por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo denso e o interstício do mesmo é composto por um tecido conjuntivo frouxo, retraído provavelmente por artefatos da técnica, permeado por vasos sanguíneos.

Também foi observado, histologicamente, que existe um gradual aumento de diâmetro do ducto dos epidídimos de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* ao longo do comprimento deste ducto, partindo dos ductos eferentes. Nas espécies analisadas, o ducto

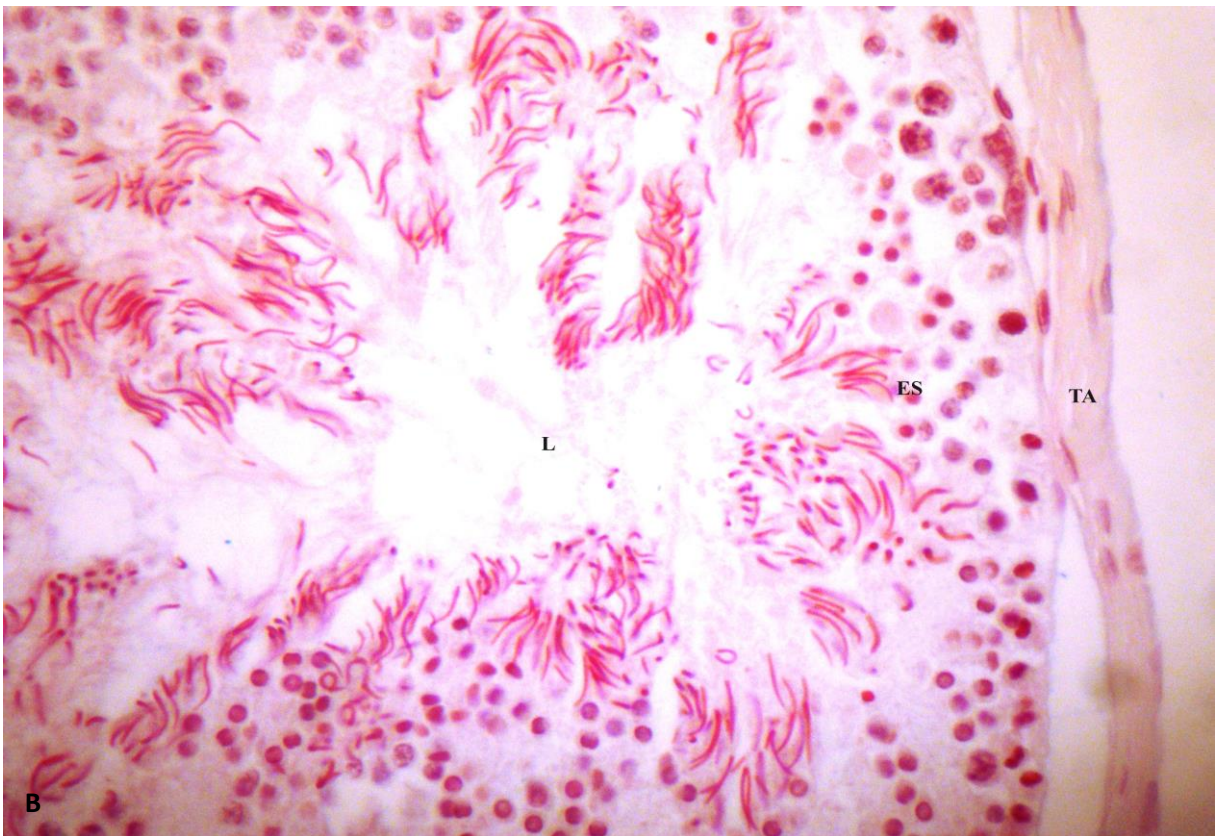
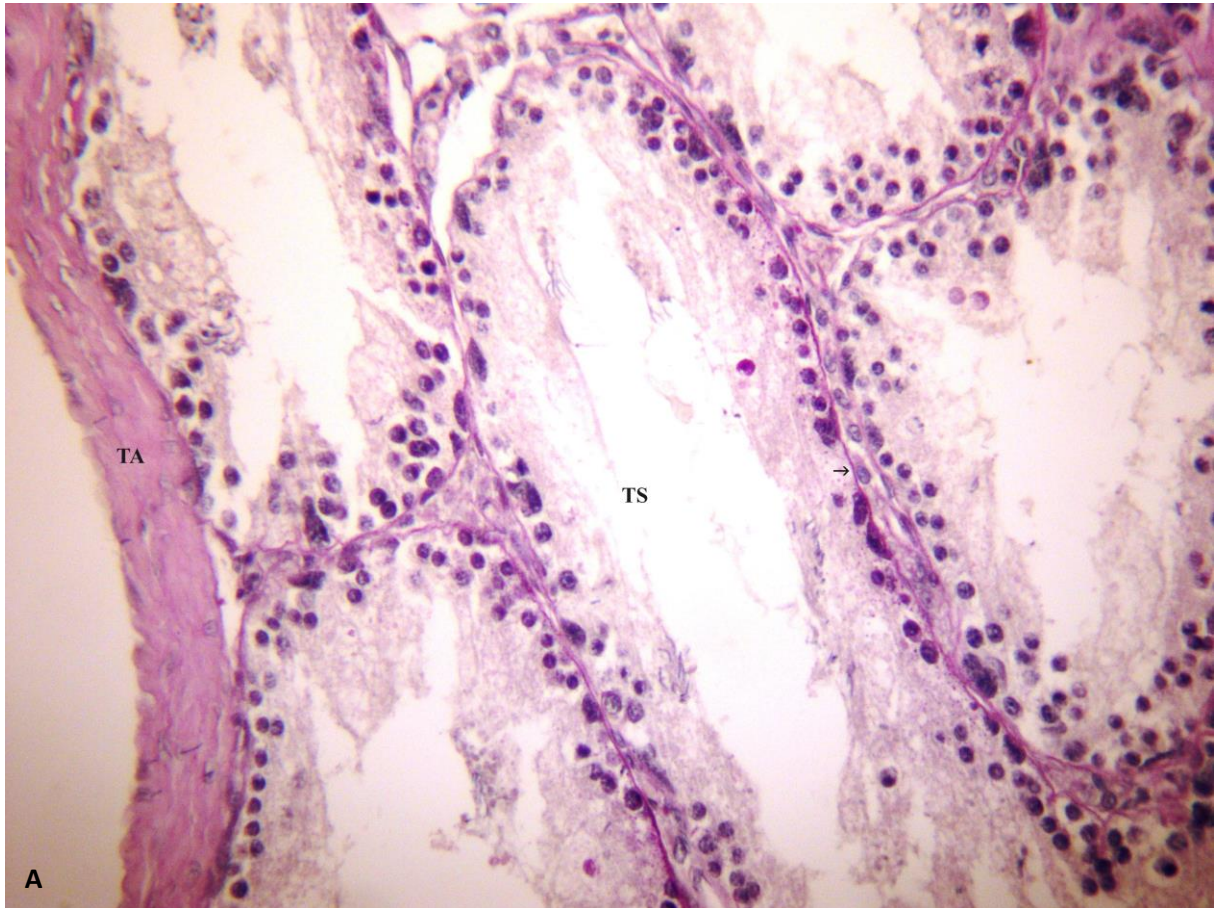


epididimário é revestido, internamente por um epitélio que varia de cilíndrico simples a cúbico simples com estereocílios, de acordo com o diâmetro do ducto (Fig. 22). As células epiteliais se apoiam sobre uma membrana basal que é rodeada por uma camada de fibras musculares lisas e por tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos e fibras colágenas que foram evidenciadas pela coloração com o tricrômico de Mallory (Figs. 23a e 23B).



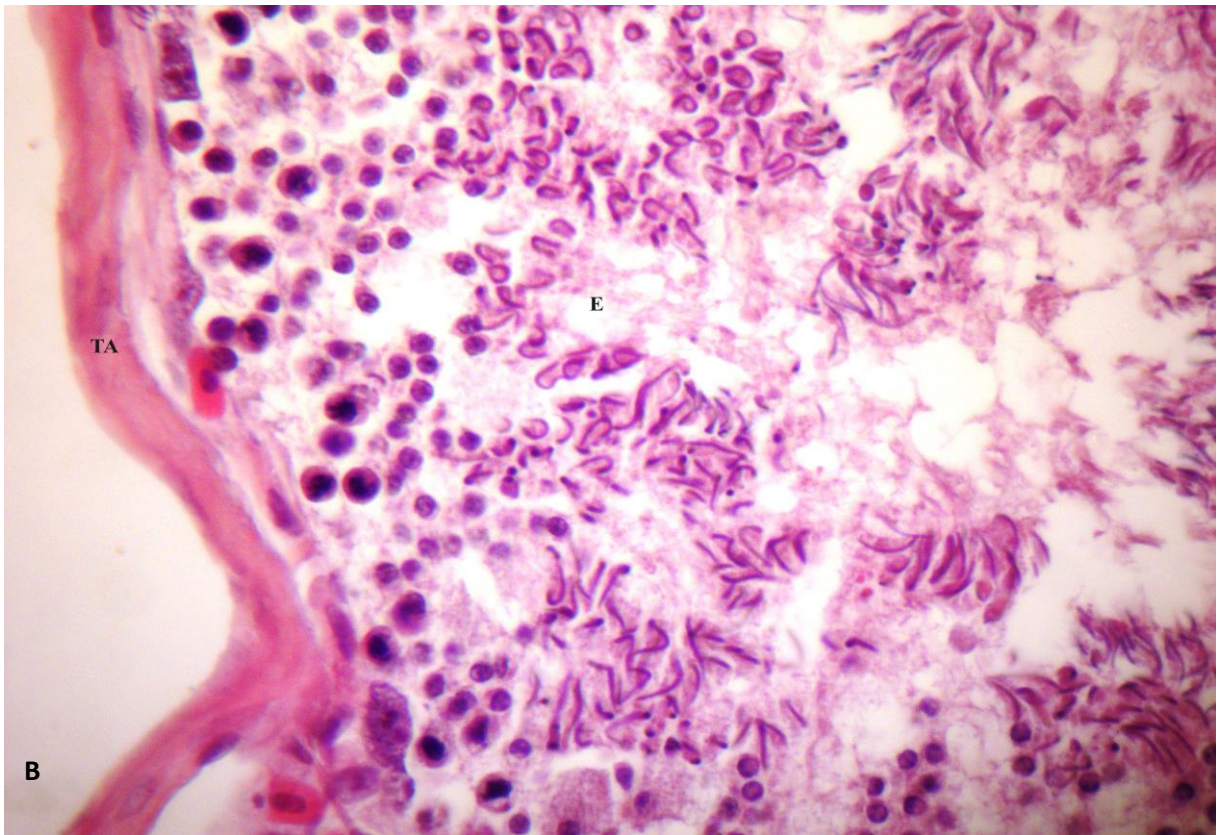
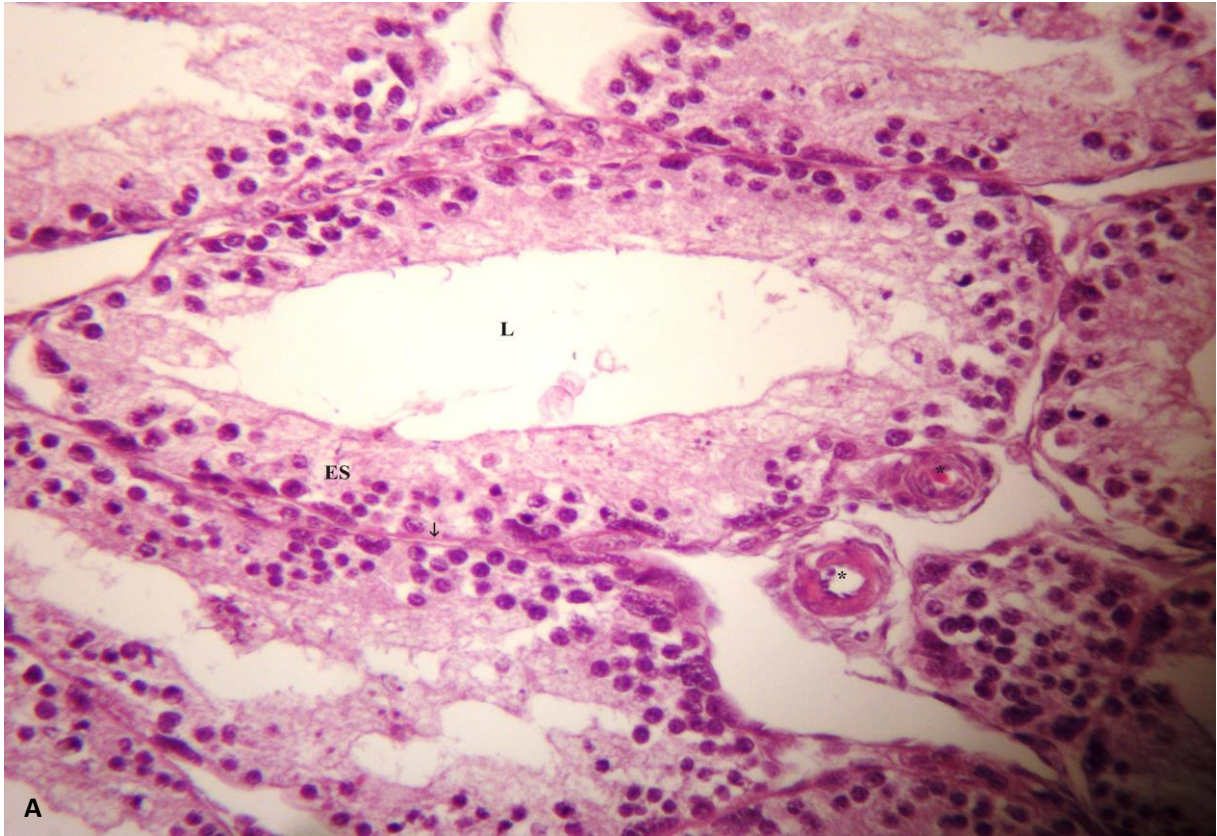
**Figura 19:** Fotomicrografia do testículo de *E. perditus*. Túnica albugínea (A) rica em fibras colágenas, evidenciadas pelo tricrômico de Mallory. Fibras dividem o órgão em lóbulos, delimitando os túbulos seminíferos (TS). Tecido intersticial evidenciando as células intersticiais (↓). (tricrômico de Mallory). Aumento de 630x.





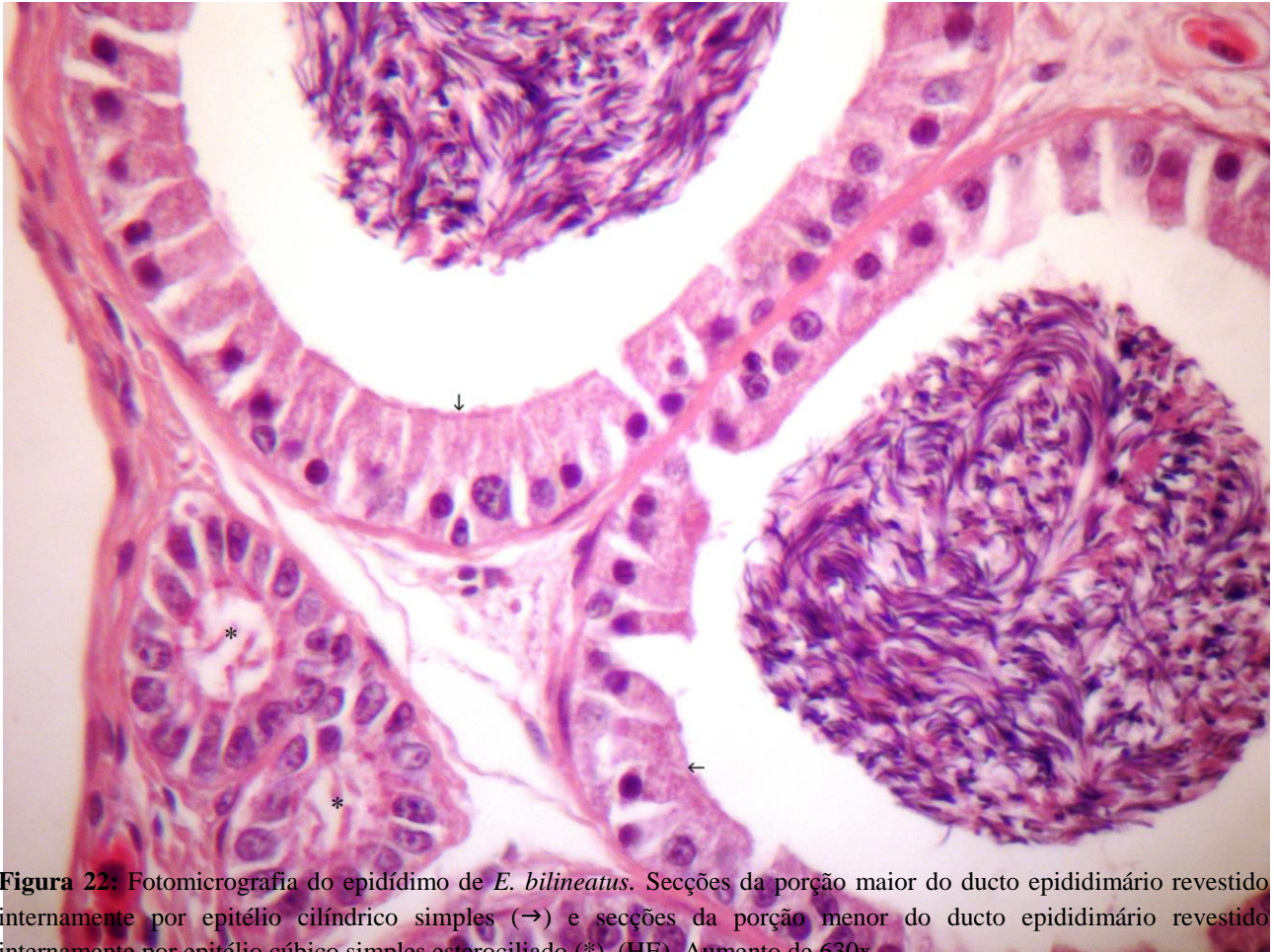
**Figura 20:** A) Fotomicrografia dos túbulos seminíferos de *E. perditus*, Em evidência a túnica albugínea (TA) e o tecido intersticial (TI) que reagiram moderadamente ao PAS e os túbulos seminíferos (TS). (PAS). Aumento de 300x. B) Fotomicrografia dos túbulos seminíferos de *E. bilineatus*. Túnica albugínea (A), as células do epitélio seminífero (ES) e o lúmen (L), ambos negativos ao AB. Aumento de 1150x.





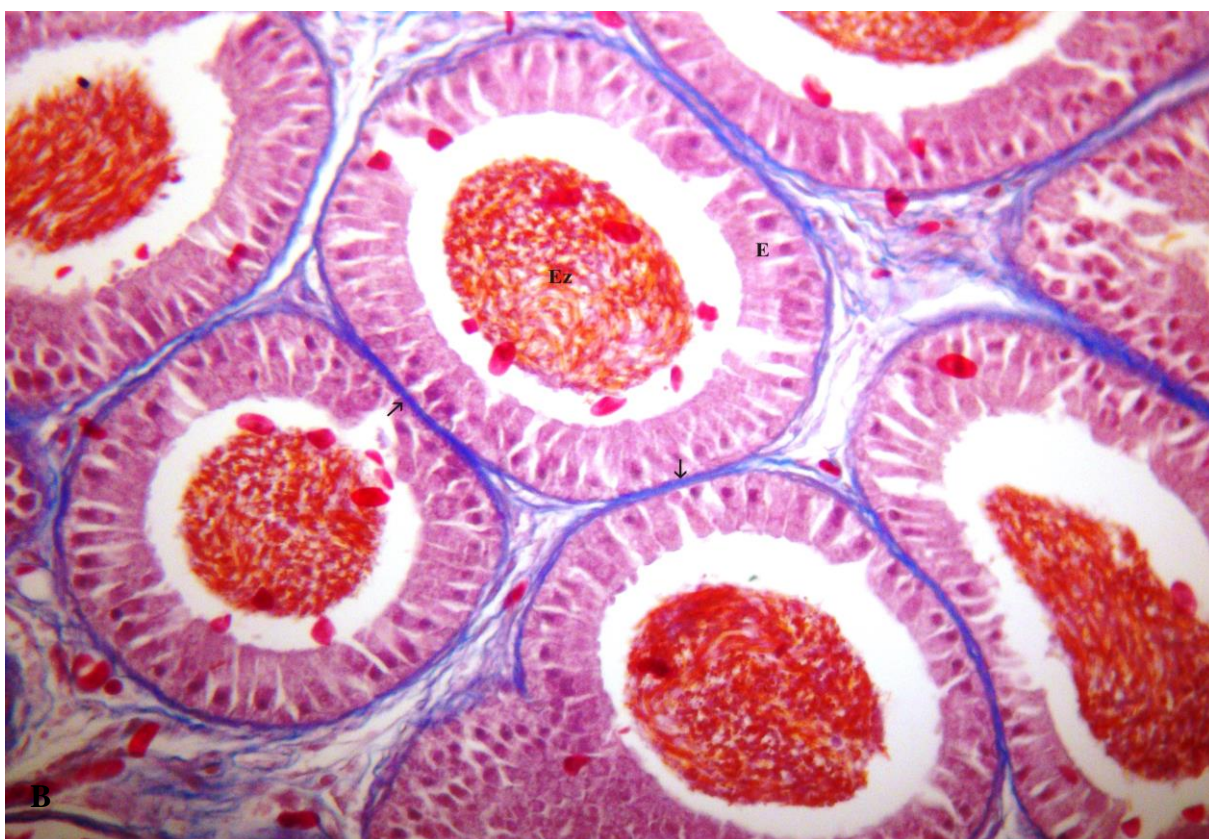
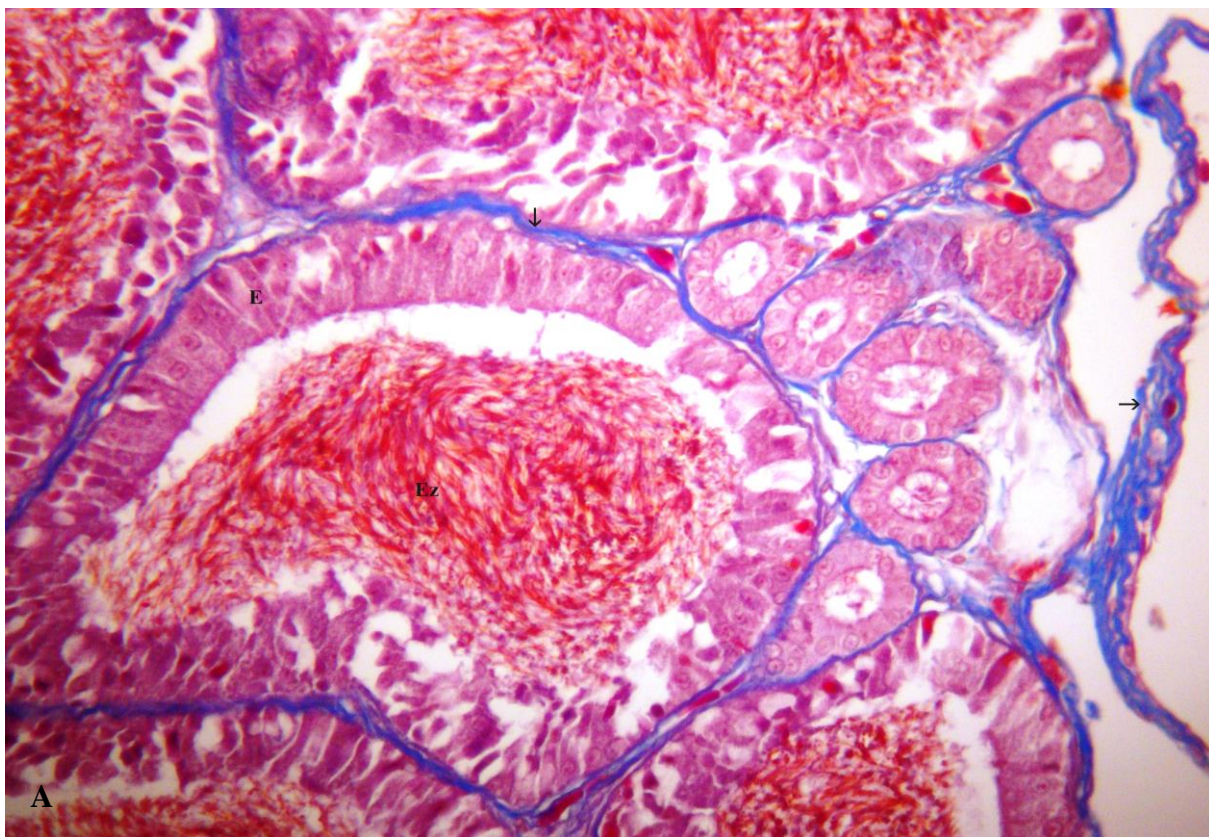
seminífero (ES), túnica própria (↓) e vasos sanguíneos (\*) (HE). Aumento de 630x. B) Fotomicrografia do ciclo do epitélio seminífero de *E. bilineatus*. Túnica albugínea (TA), epitélio seminífero (E). (HE). Aumento de 1150x.





**Figura 22:** Fotomicrografia do epidídimo de *E. bilineatus*. Secções da porção maior do ducto epididimário revestido internamente por epitélio cilíndrico simples (→) e secções da porção menor do ducto epididimário revestido internamente por epitélio cúbico simples esterociliado (\*). (HE). Aumento de 630x.

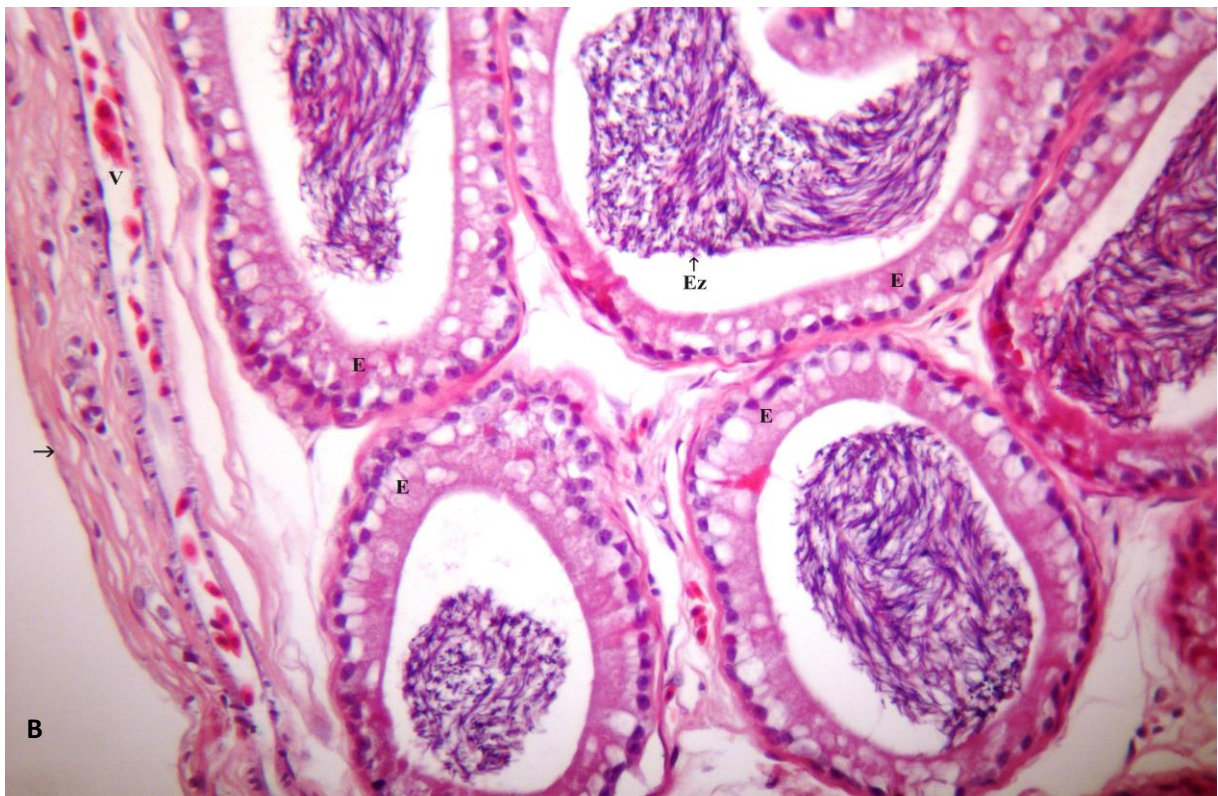
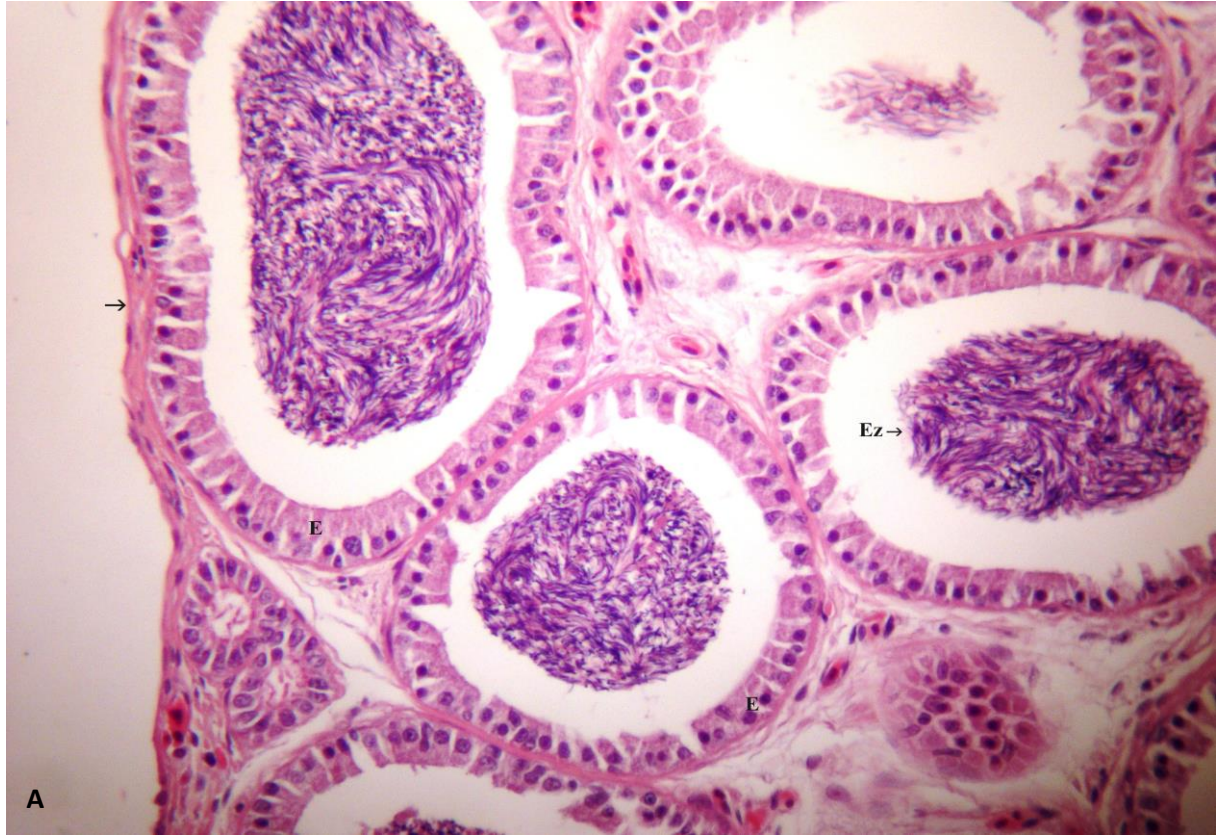




**Figura 23:** A) Fotomicrografia do epidídimo de *E. perditus*. (Tricrômico de Mallory). Aumento de 300x. B) Fotomicrografia do epidídimo de *E. bilineatus*. (Tricrômico de Mallory). Aumento de 300x. Cápsula e septos de tecido conjuntivo (↗) com muitas fibras colágenas evidenciadas pelo Tricrômico de Mallory, espermatozoides (EZ) e epitélio epididimário (E).

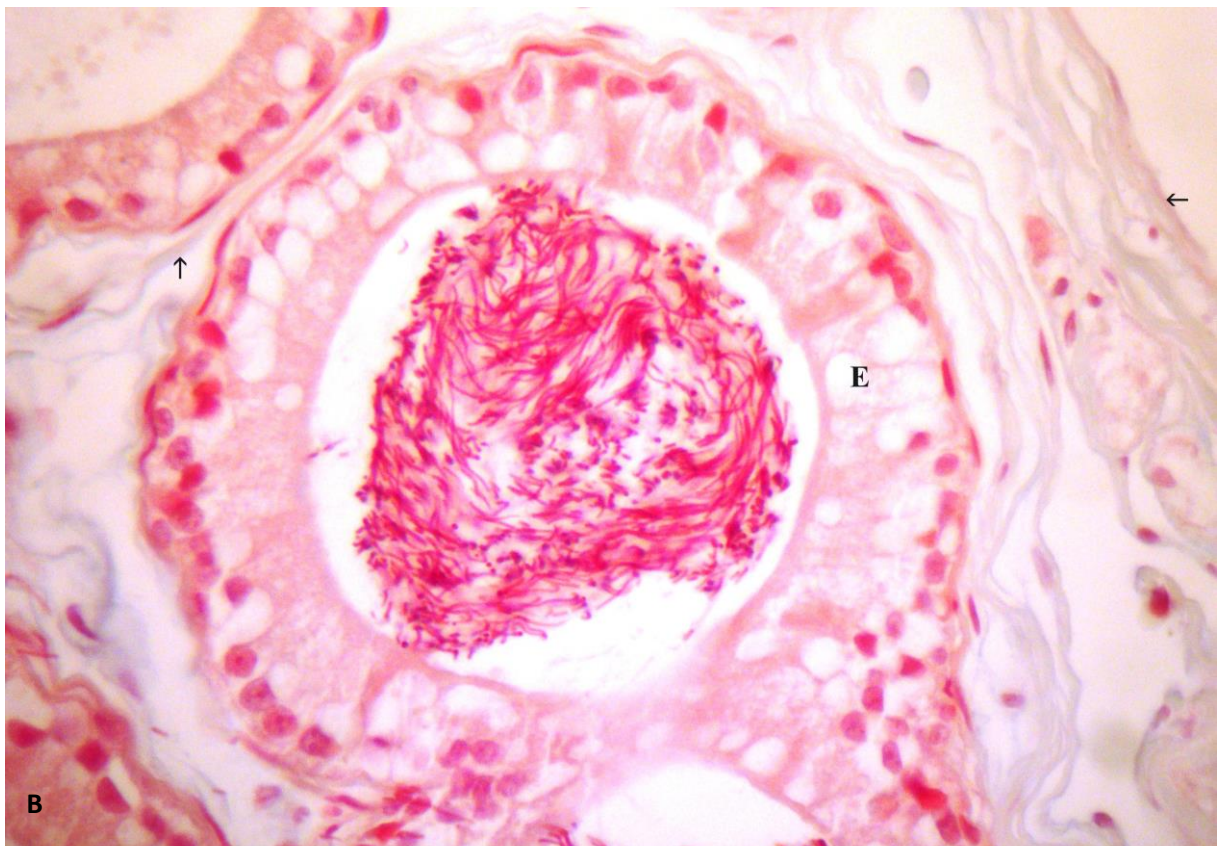
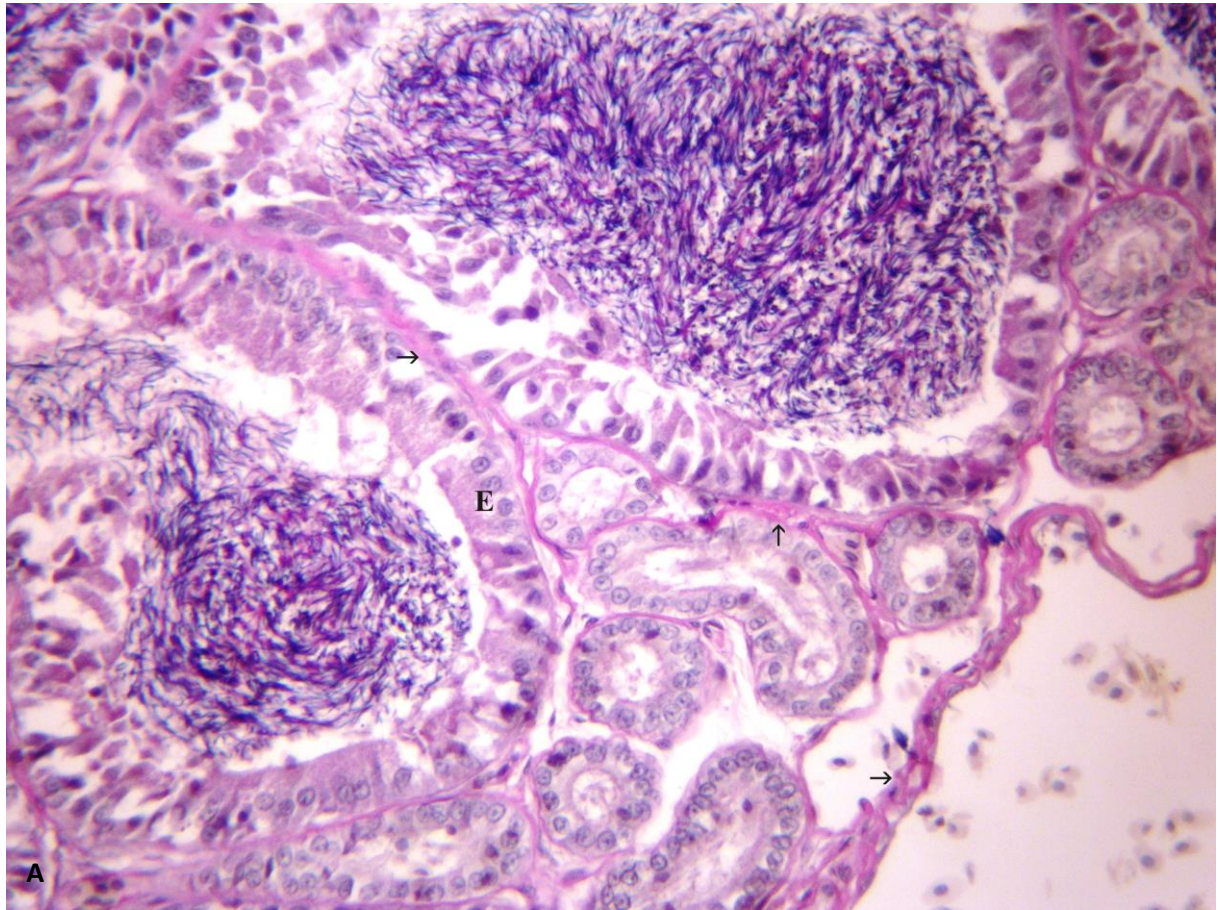
Em *E. bilineatus*, o epitélio do ducto do epidídimo é simples composto por células principais, denominadas como células secretoras, com formato cilíndrico e citoplasma acidófilo. Em *E. perditus* e *U. vautieri*, o epitélio do ducto do epidídimo também é simples formado por células principais cilíndricas, no entanto, estas apresentam vesículas secretoras em seu citoplasma (Figs. 24A e 24B). No interior do ducto epididimário observa-se espermatozoides e em torno da parede do ducto nota-se a presença de fibras musculares lisas e tecido conjuntivo que reagiu positivamente ao PAS, indicando a presença de glicosaminoglicanas neutras, no entanto, não reagiu ao Alcian blue (Figs. 25A e 25B).





**Figura 24:** A) Fotomicrografia do epidídimo de *E. bilineatus*. Cápsula (seta). Ducto epididimário revestido por epitélio simples cilíndrico (E) formado por células principais. No interior do ducto observa-se espermatozoides (Ez). (HE). Aumento de 630x. B) Fotomicrografia do epidídimo de *U. vautieri*. Ducto epididimário revestido por epitélio simples cilíndrico (E) formado por células principais com vesículas secretoras. (HE). Aumento de 630x.





**Figura 25:** A) Fotomicrografia do epidídimo de *E. perditus*. Células epiteliais (E) PAS negativa e tecido conjuntivo (→) PAS positivo. Aumento de 300x. B) Fotomicrografia do epidídimo de *U. vautieri*. Células epiteliais (E) e tecido conjuntivo (→) ambos AB negativo. Aumento de 1150x. Espermatozoides (Ez).

Os cortes histológicos de testículos e epidídimos de todos os machos analisados sugerem que estes encontravam-se em plena maturidade sexual, visto que foram observadas células da linhagem espermatogênica no epitélio seminífero e espermatozoides na luz dos ductos epididimários.

### 6.2.2 - Imunolocalização de proteínas do citoesqueleto nos testículos e epidídimos

Não foi detectada coloração de fundo (background) nas secções de testículos e epidídimos utilizadas como controle negativo, no entanto foram observadas reações positivas para alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina nos cortes histológicos utilizadas como controle positivo (Figs. 11A-C).

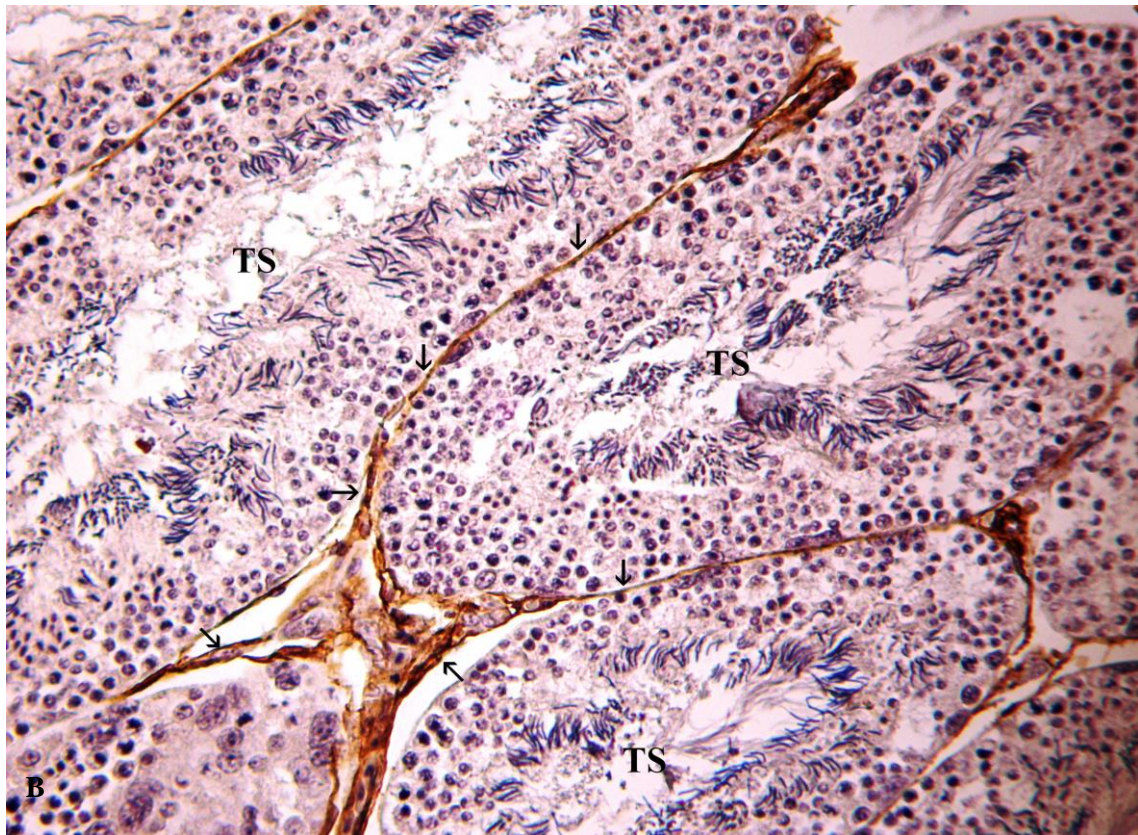
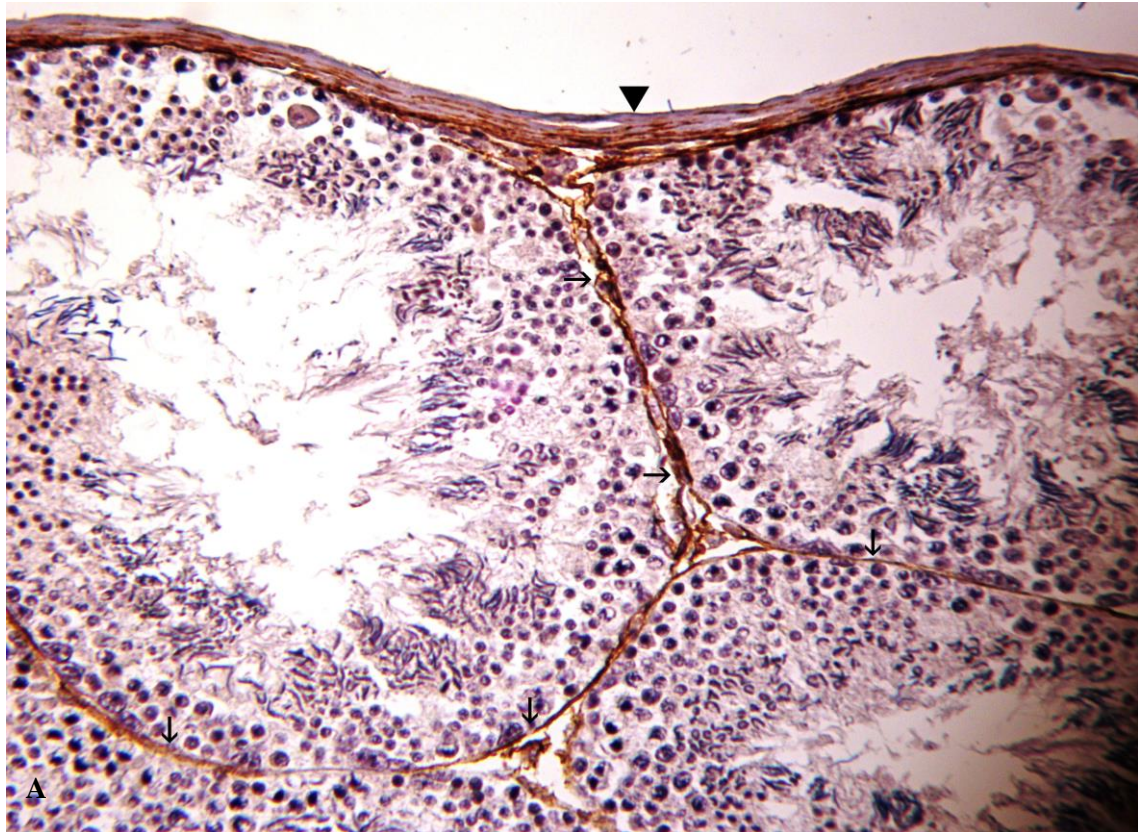
A intensidade relativa da imunolocalização de alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina nos testículos e epidídimos dos lagartos analisados foi estabelecida utilizando-se do sistema de cruzes (-) ausente, (++) moderada e (+++) acentuada (Tabela 4).

**Tabela 4.** Intensidade relativa da imunorreatividade nos testículos e epidídimos dos leiosaurídeos investigados.

	<i>E. perditus</i>		<i>E. bilineatus</i>		<i>U. vautieri</i>	
	Testículos	Epidídimos	Testículos	Epidídimos	Testículos	Epidídimos
Alfa-actina	+++	++	+++	++	+++	++
Desmina	++	+++	+++	+++	++	-
Vimentina	-	-	-	-	-	-

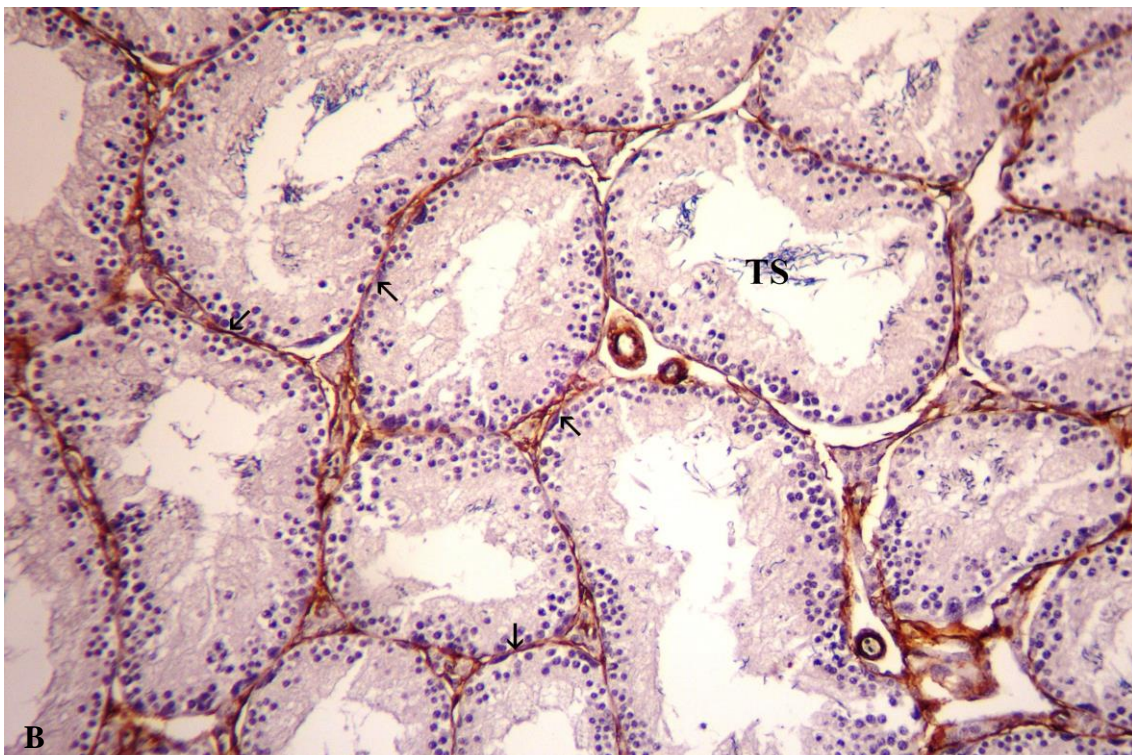
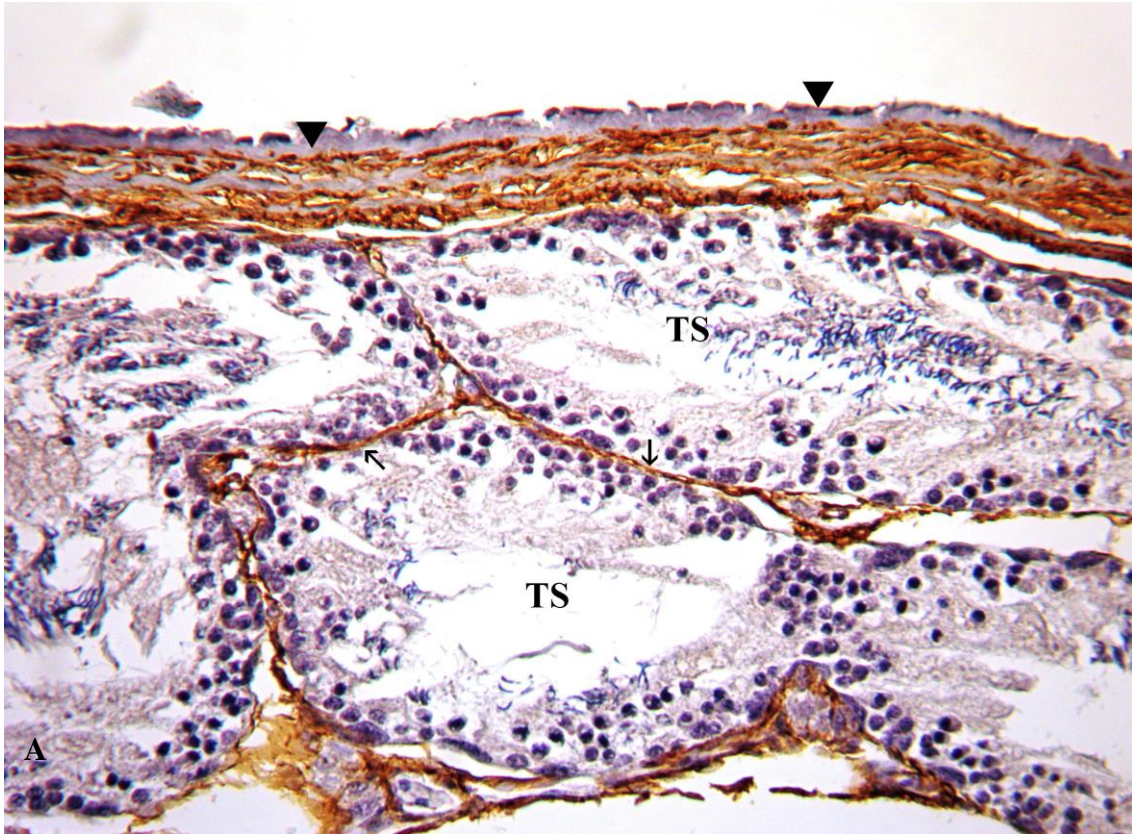
Nos testículos, de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* verificou-se imunolocalização positiva acentuada para alfa-actina de músculo liso no tecido conjuntivo denso da túnica albugínea, assim como, o tecido conjuntivo frouxo que delimita os túbulos seminíferos (Figs. 26, 27 e 28). As células endoteliais dos vasos sanguíneos adjacentes aos túbulos seminíferos, também ocorreu imunolocalização positiva para alfa-actina de músculo liso, em todos os lagartos estudados (Figs. 29A-B).





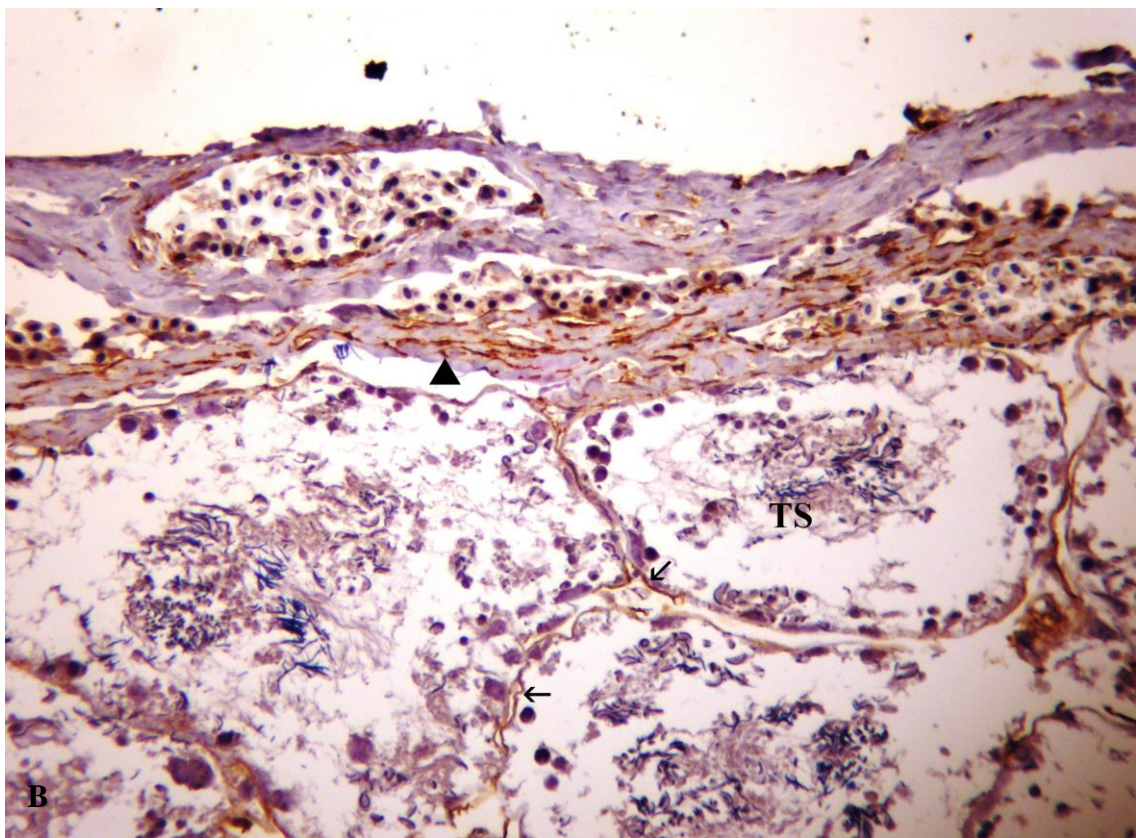
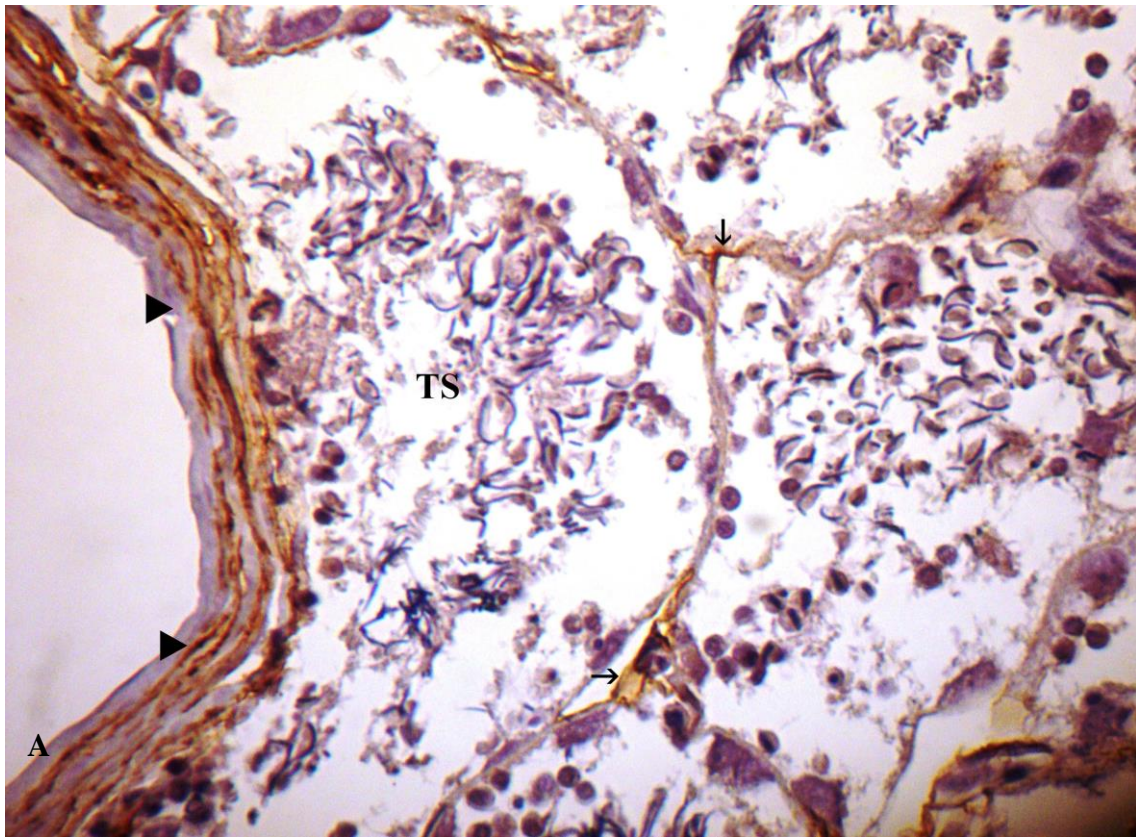
**Figura 26:** Fotomicrografias dos testículos de *E. bilineatus*. Em **A**, imunolocalização positiva acentuada para alfa-actina na albugínea testicular (▼) e no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→). Aumento de 630x. Em **B**, imunolocalização positiva para alfa-actina no tecido intersticial. (TS) Túbulos seminíferos. Aumento de 630x.





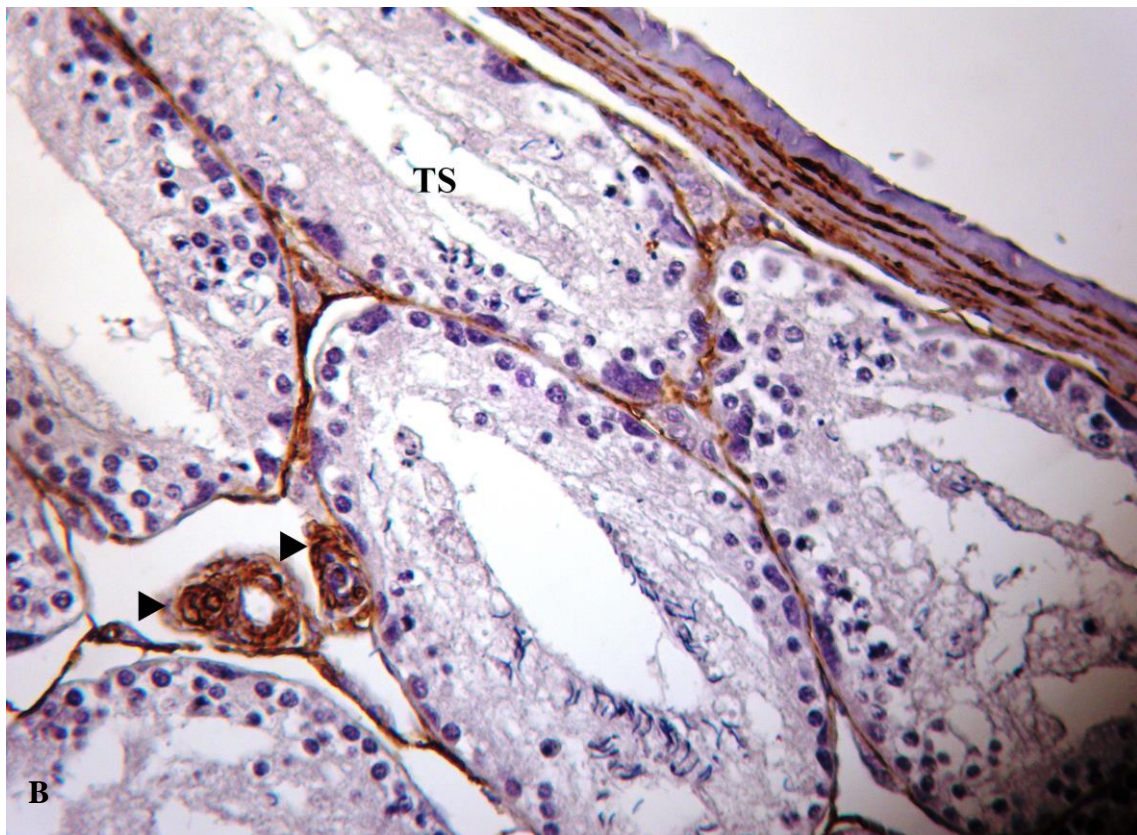
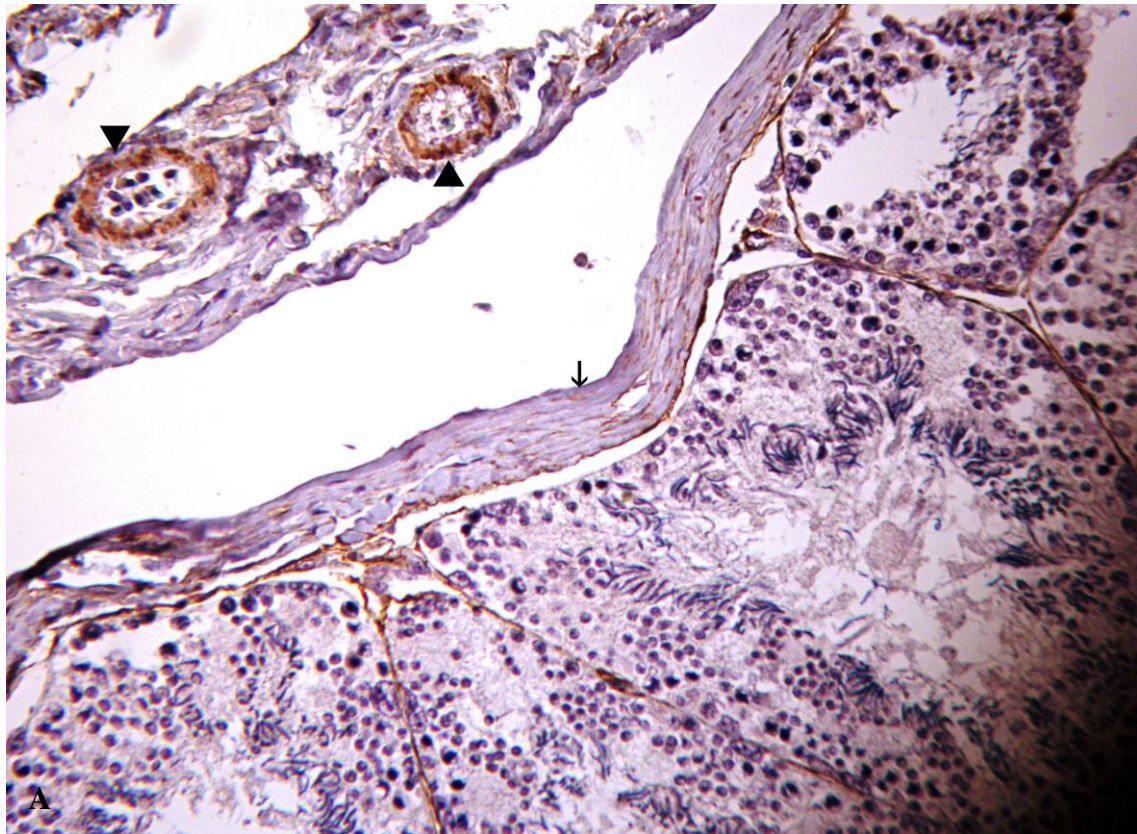
**Figura 27:** Fotomicrografias dos testículos de *E. perditus*. **A)** Imunolocalização positiva para alfa-actina em filamentos da albugínea testicular (▼) e no tecido intersticial (→). (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 1150x. **B)** Imunolocalização para alfa-actina no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→) e em vasos sanguíneos. (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 630x.





**Figura 28:** Fotomicrografias dos testículos de *U. vautieri*. Em **A**, imunolocalização positiva para alfa-actina na albugínea testicular (▼) e no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→). Aumento de 1150x. Em **B**, imunolocalização positiva para alfa-actina em filamentos da albugínea testicular (▼) e no tecido intersticial (→) (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 630x.

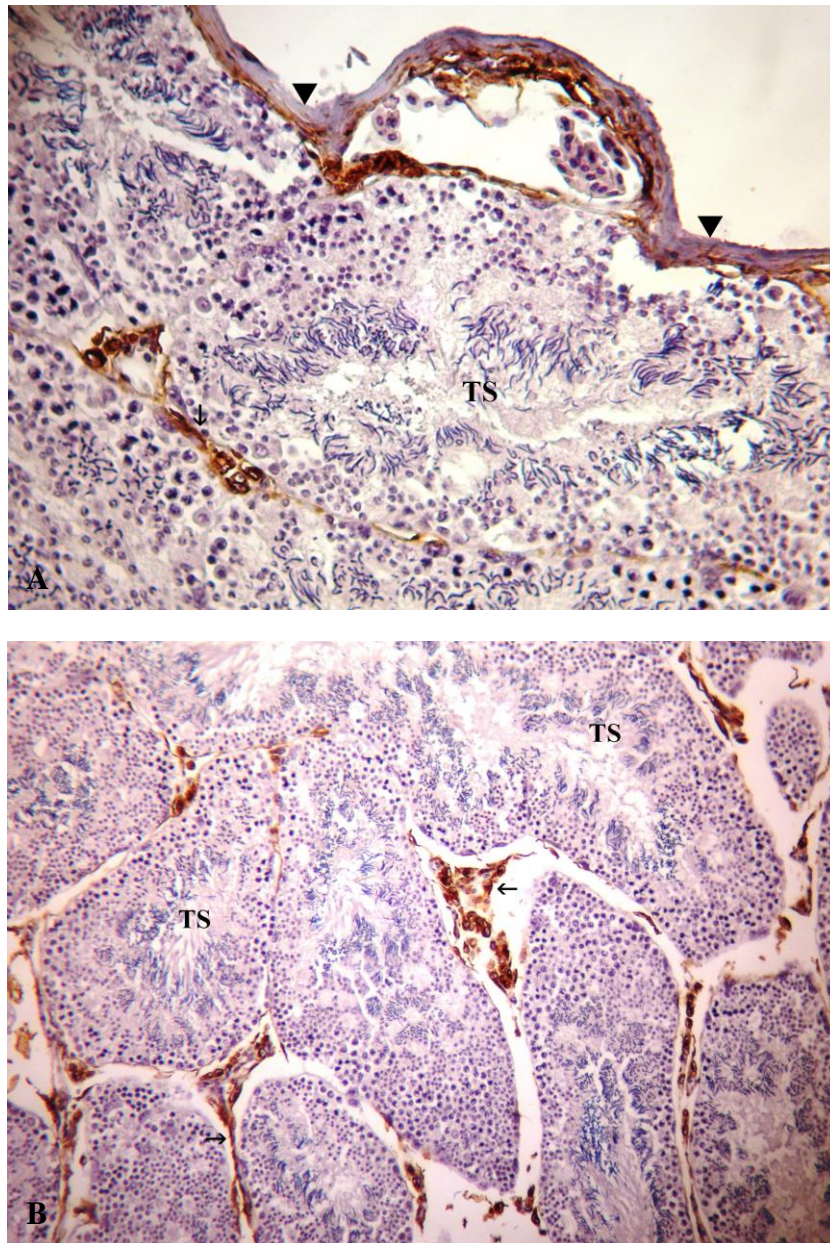




**Figura 29:** A) Fotomicrografia do testículo de *E. bilineatus*. Imunolocalização positiva para alfa-actina nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (▶). Aumento de 630x. B) Fotomicrografia do testículo de *E. perditus*. Imunolocalização positiva para alfa-actina nos vasos sanguíneos (▶). Aumento de 630x. (TS) túbulos seminíferos. (→) albugínea testicular.

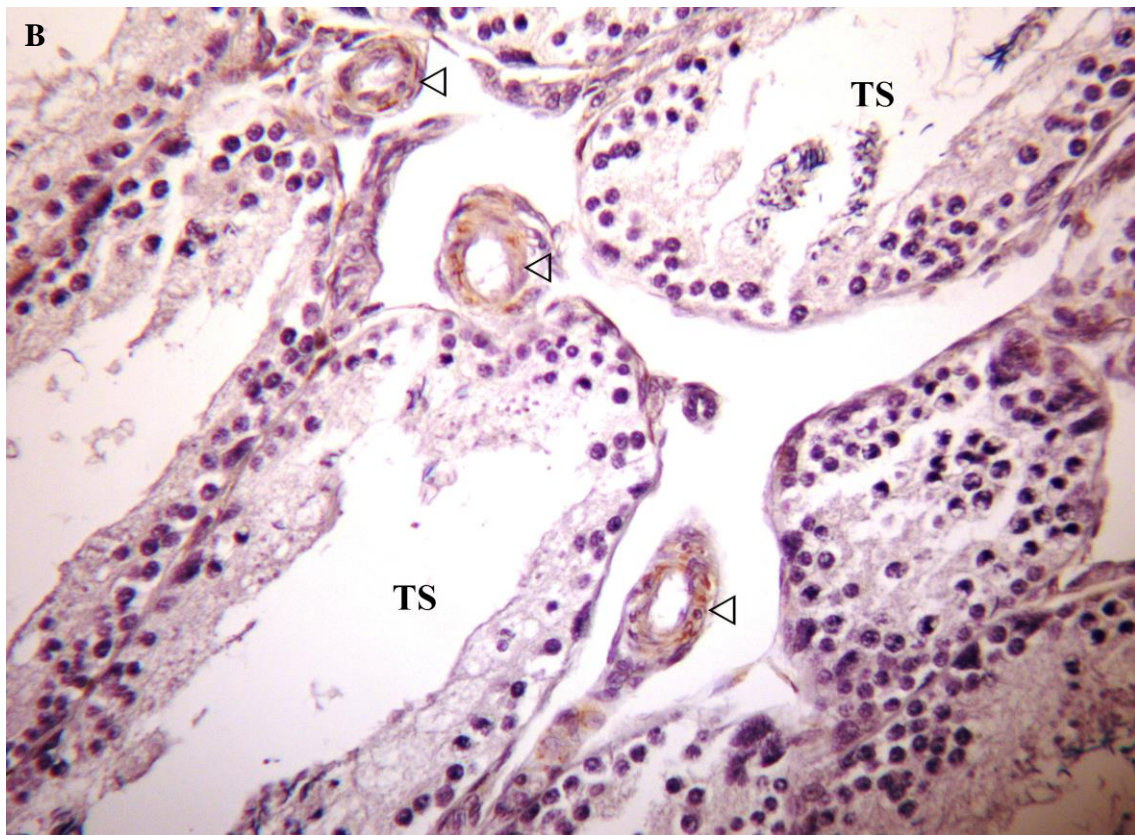
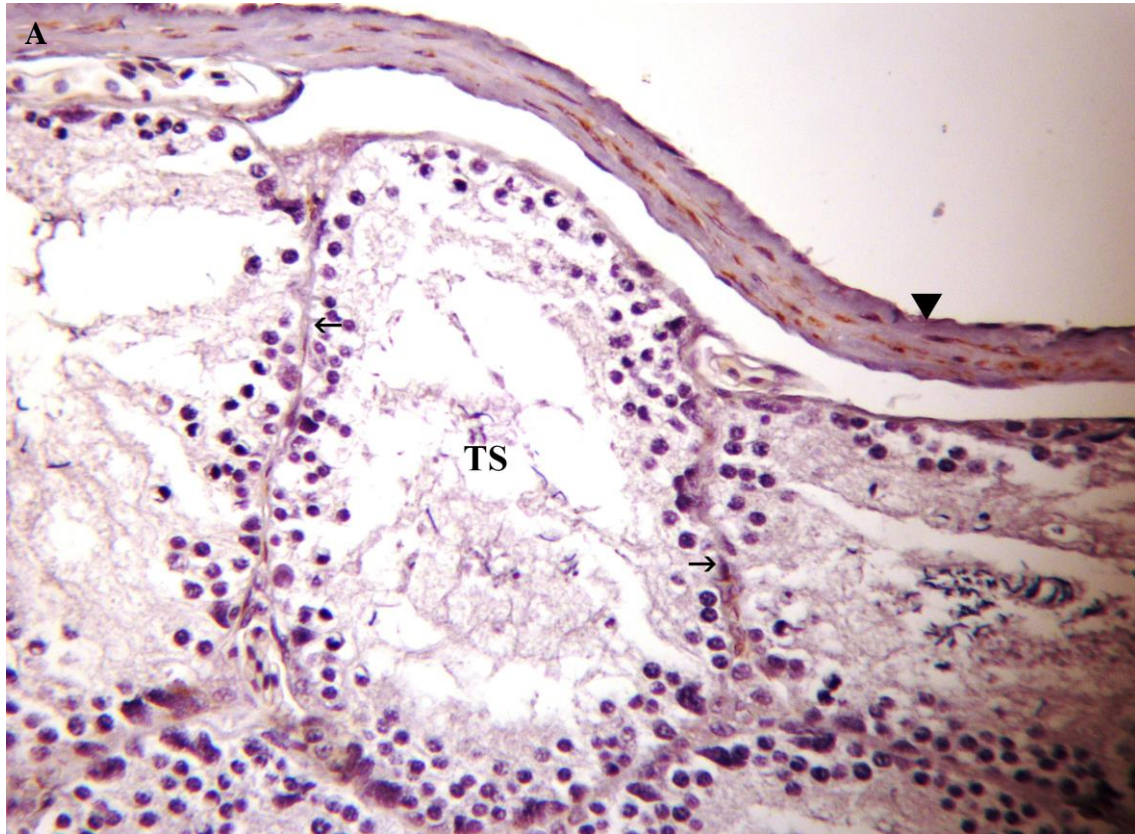


No presente estudo, observou-se imunolocalização acentuada para desmina, nas fibras da albugínea testicular de *E. bilineatus*, enquanto em *E. perditus* e *U. vautieri* a imunorreação foi moderada. No tecido conjuntivo que invade os testículos, delimitando os túbulos seminíferos, apenas em *E. bilineatus* ocorreu imunorreação acentuada para esta proteína de filamento intermediário (Figs. 30A, 31A e 32A). Nos três lagartos avaliados, as células endoteliais dos vasos sanguíneos localizados próximos e dentro dos testículos, também demonstraram imunolocalização positiva para desmina (Figs. 30B, 31B e 32B).



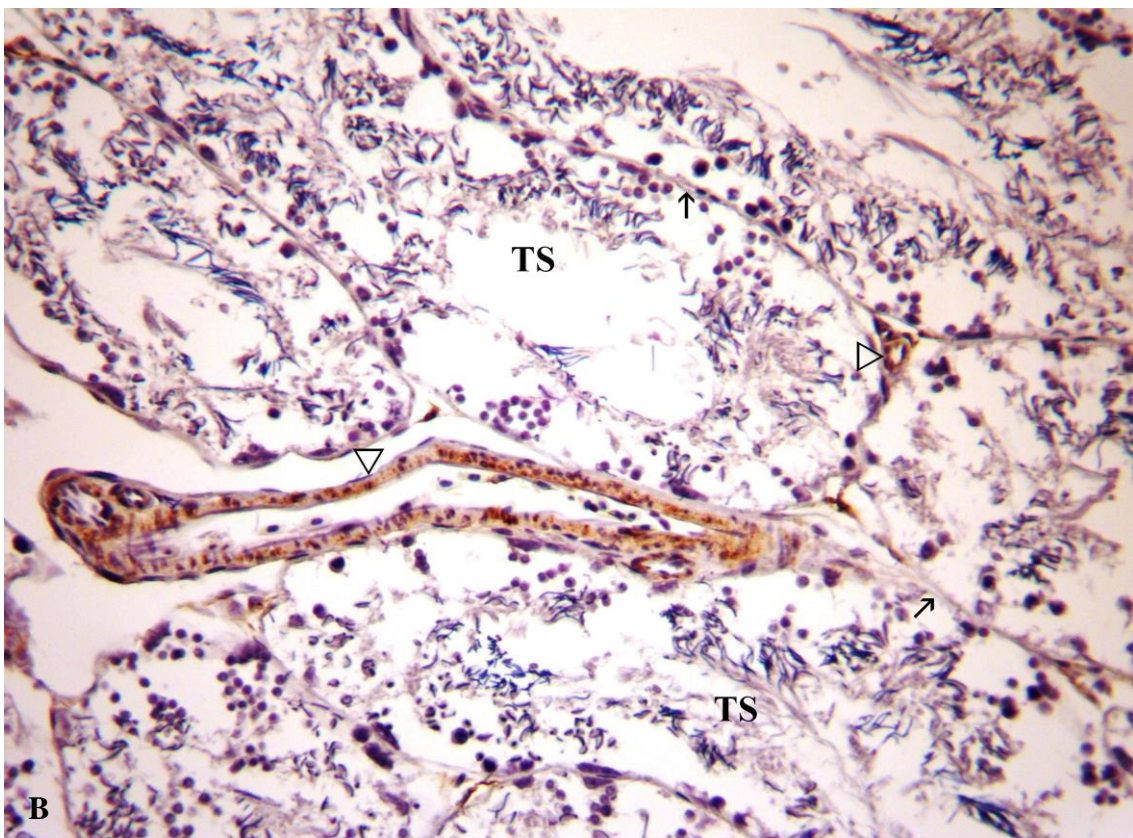
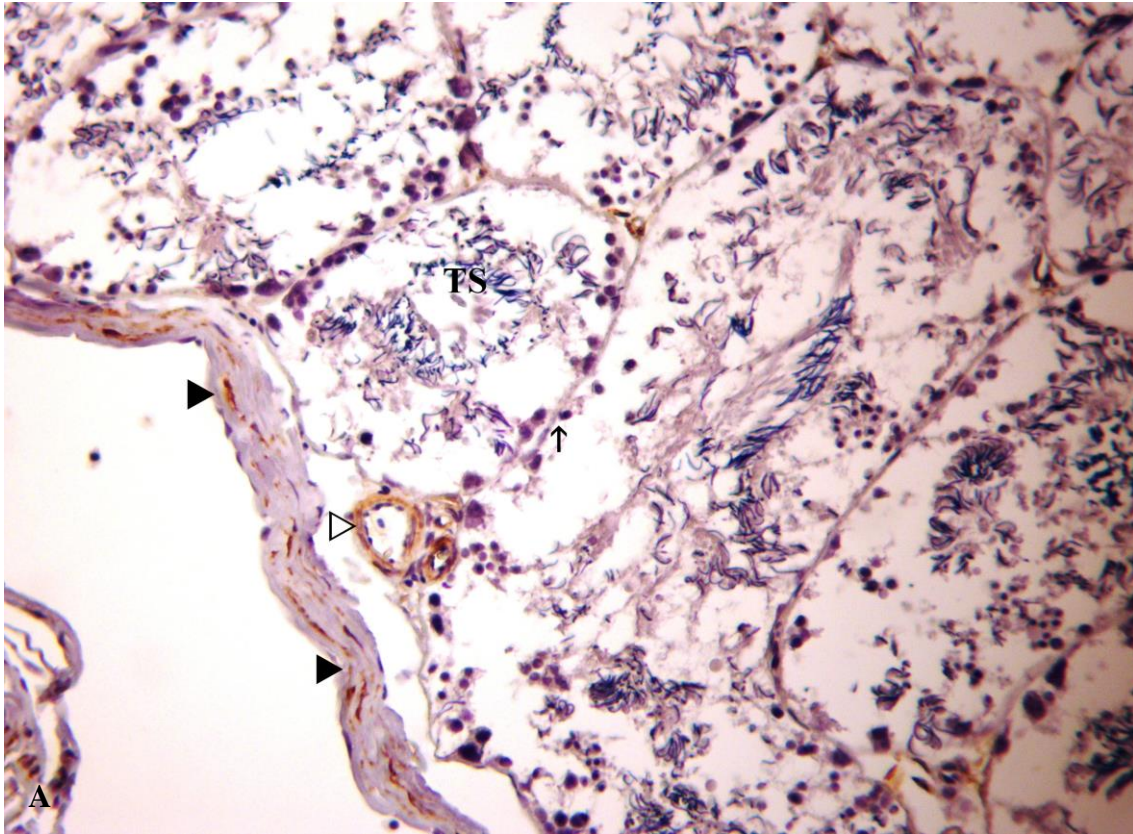
**Figura 30:** Fotomicrografias do testículo de *E. bilineatus*. Em **A**, imunolocalização positiva para desmina na albugínea testicular (▼) e no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→). Aumento de 630x. Em **B**, imunolocalização positiva para desmina no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (→). (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 300x.





**Figura 31:** Fotomicrografias do testículo de *E. perditus*. Em **A**, Imunolocalização positiva moderada para desmina na albugínea testicular (▼) e reação negativa no tecido intersticial (→). Aumento de 630x. **B**) Imunolocalização para desmina nos vasos sanguíneos (▷) no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos. Aumento de 1150x. (TS) túbulos seminíferos.





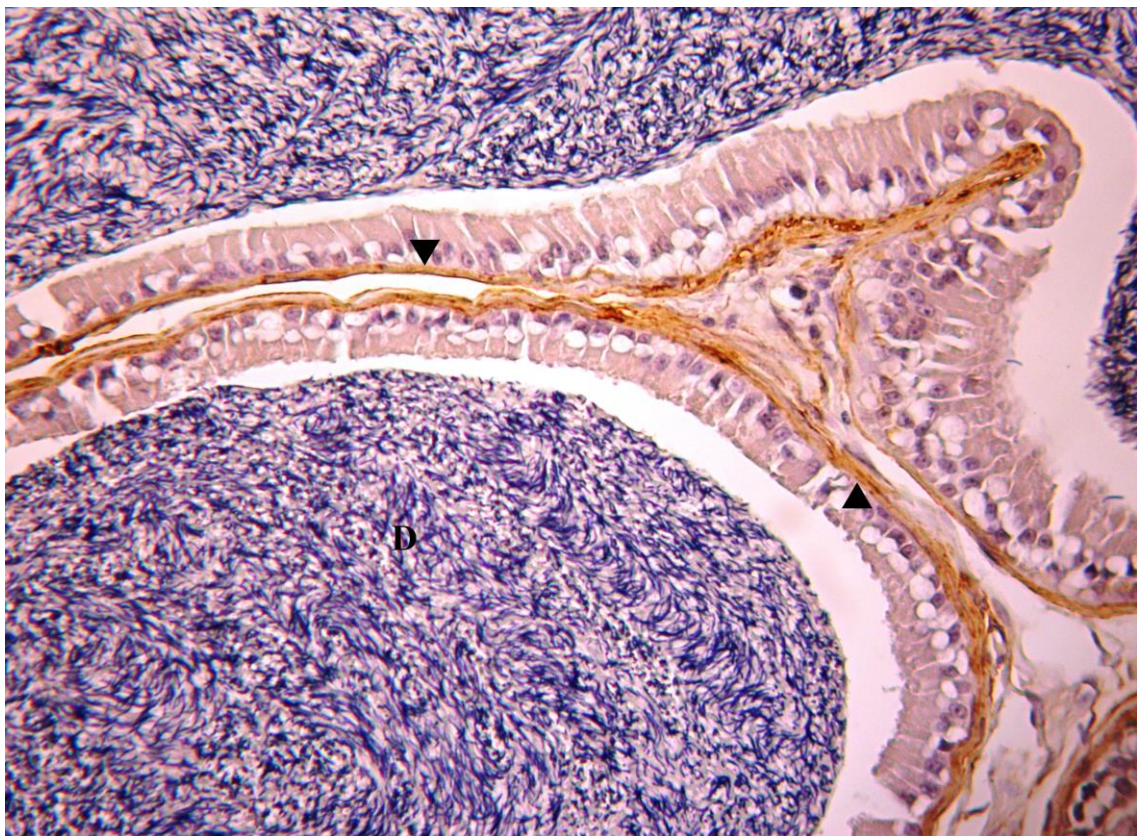
**Figura 32:** Fotomicrografias do testículo de *U. vautieri*. Em **A**, Imunolocalização positiva moderada para desmina na albugínea testicular (▼), acentuada nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (▷) e negativa no tecido intersticial (→). Aumento de 630x. **B**) Imunolocalização positiva acentuada para desmina no endotélio dos vasos sanguíneos (▷) e ausente no tecido intersticial (→). (TS) túbulos seminíferos. Aumento de 630x.



Nos epidídimos de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* observou-se reação imuno-histoquímica positiva moderada para alfa-actina de músculo liso na cápsula de tecido conjuntivo do órgão e na camada de fibras musculares lisas em arranjo circunferencial, seguidas de tecido conjuntivo intersticial na parede das secções maiores e menores do ducto epididimário (Figs. 33 e 34A-B).

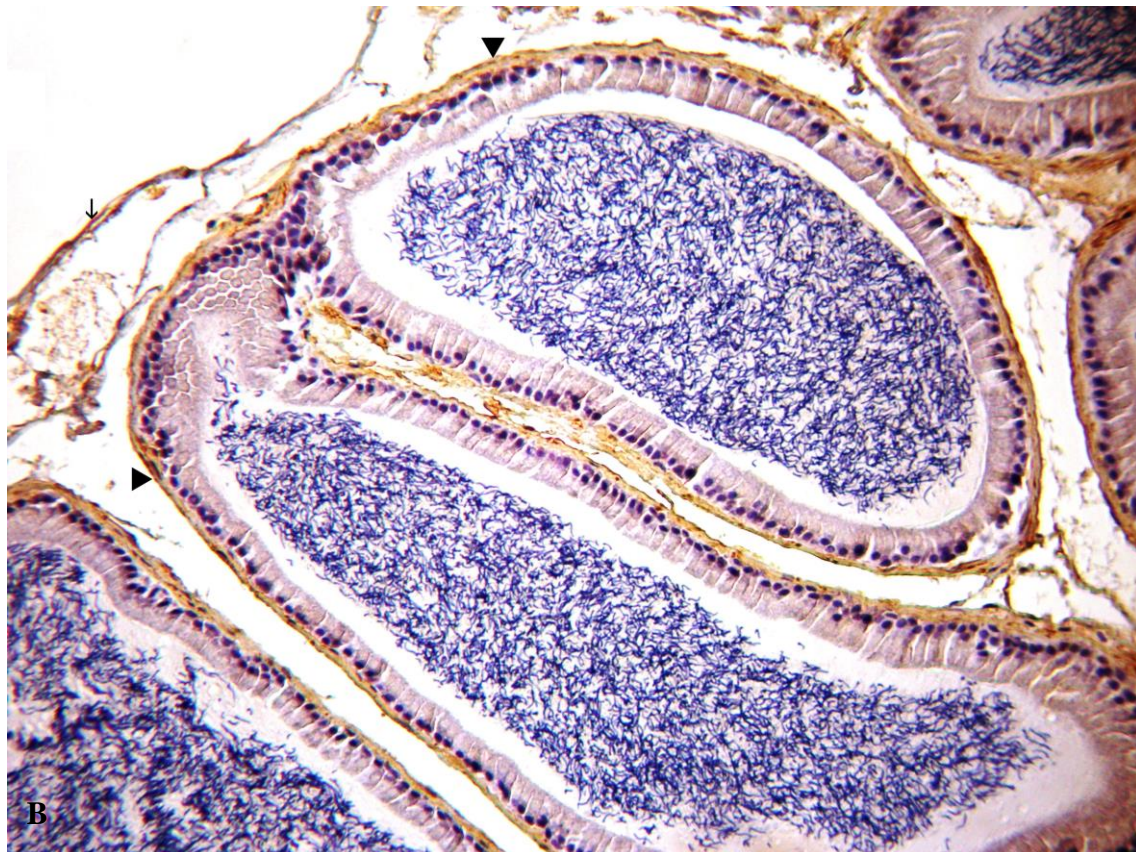
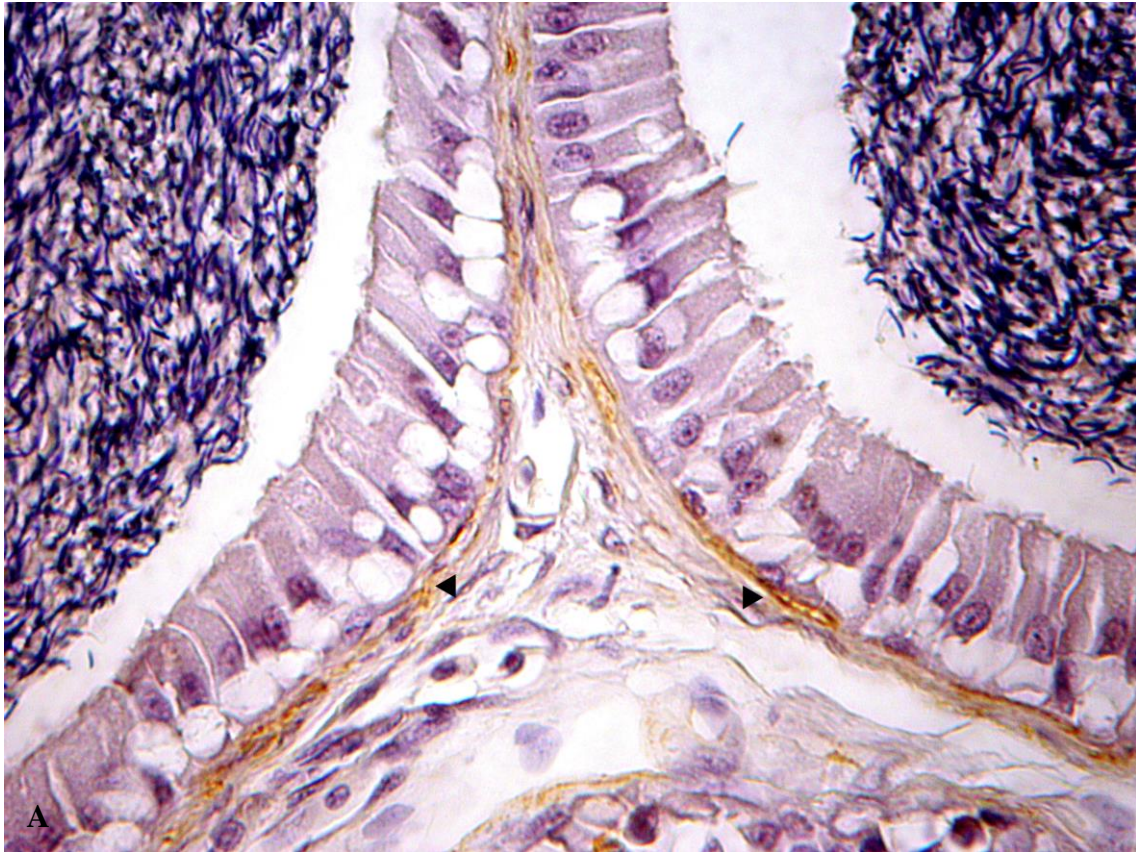
No presente estudo foi verificada a ocorrência de imunorreação positiva para desmina nos epidídimos do lagarto *E. perditus* e *E. bilineatus* (Fig. 35). Entretanto, devido à etapa crucial da técnica de imuno-histoquímica que é a recuperação antigênica com exposição ao calor, que predispõe ao descolamento do tecido da lâmina, os cortes histológicos deste órgão de *U. vautieri* não foram devidamente preservados.

Nos testículos e epidídimos dos lagartos *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri*, não houve imunomarcção para vimentina, com o clone utilizado (Figs. 36A-C).



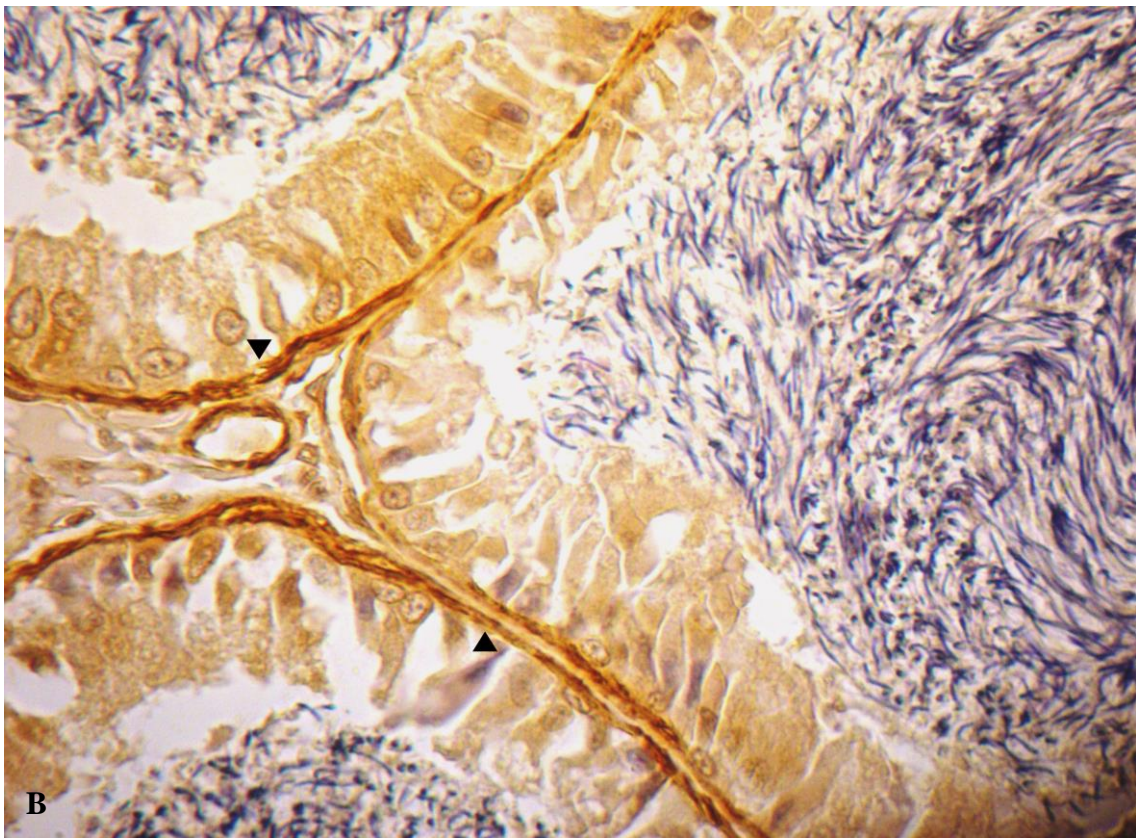
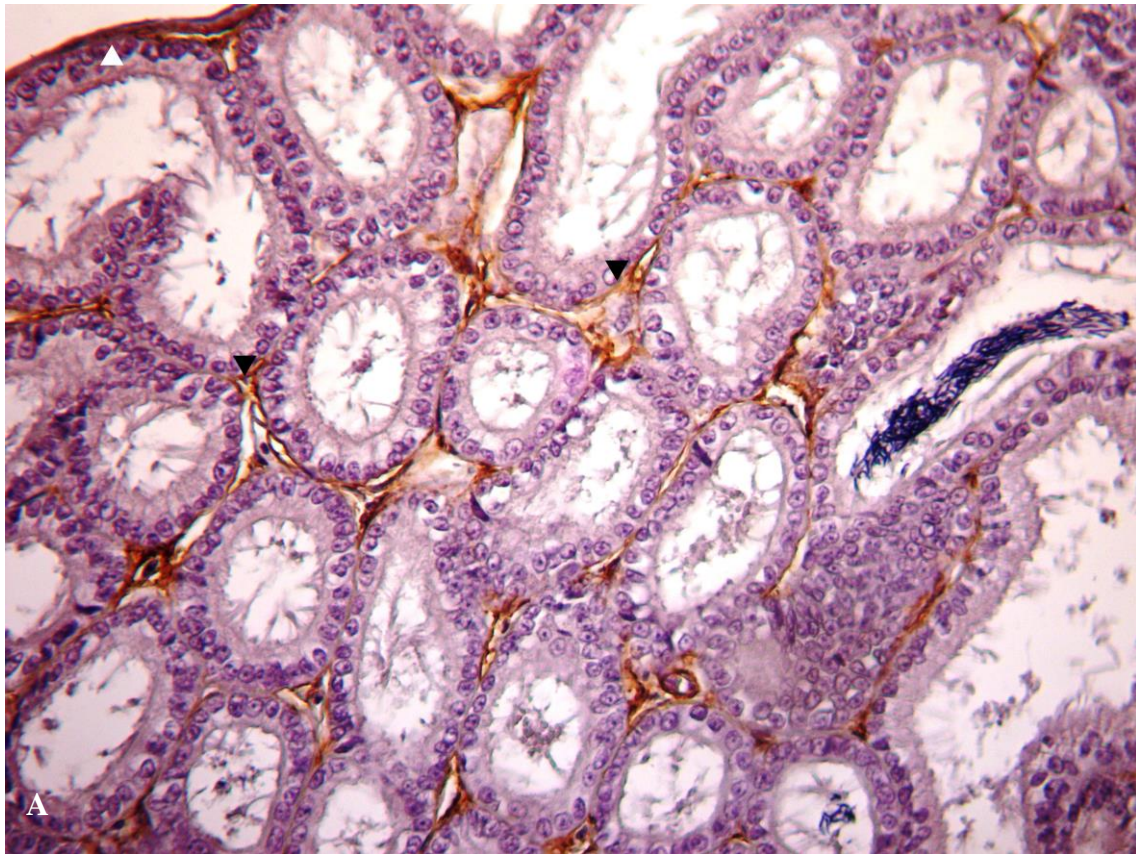
**Figura 33:** Fotomicrografia do epidídimo de *E. perditus*. Imunolocalização positiva para alfa-actina na cápsula e no tecido conjuntivo intersticial entre as secções do ducto epididimário (▼). (D) ducto do epidídimo. Aumento de 630x.





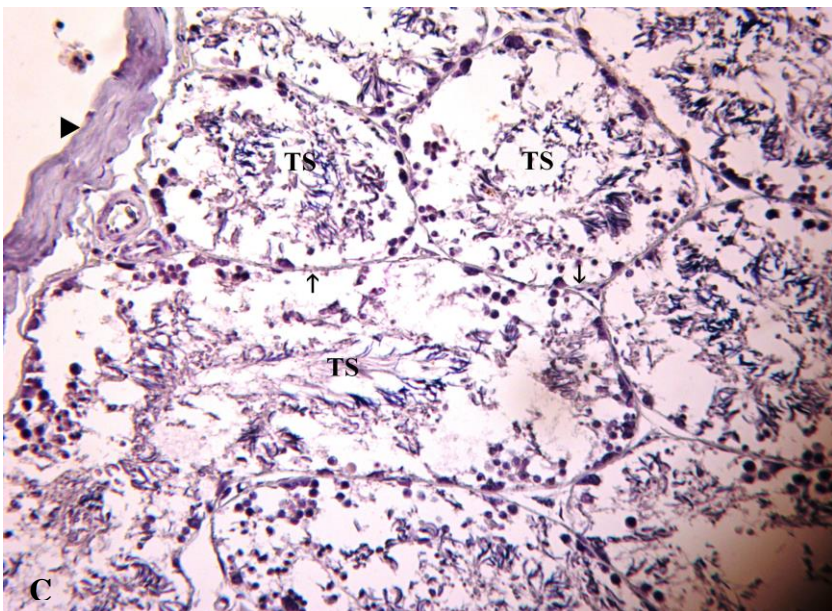
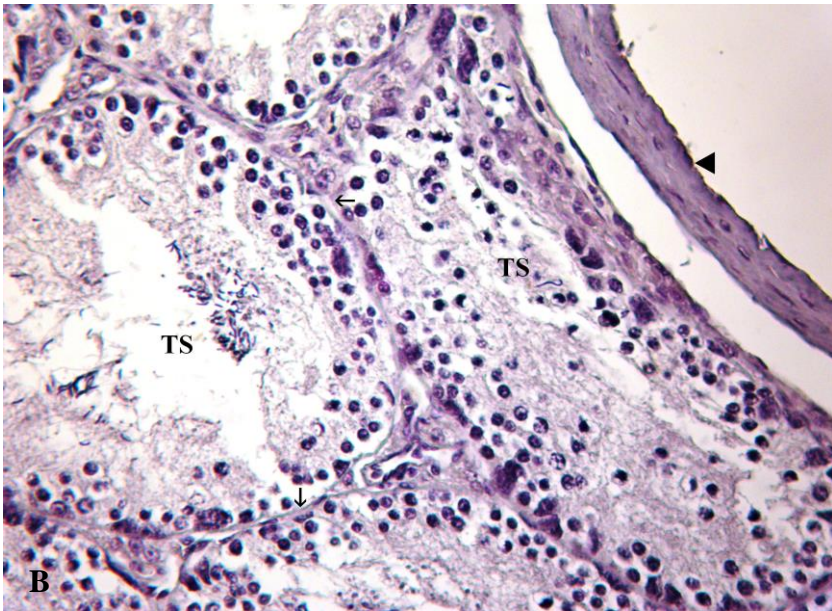
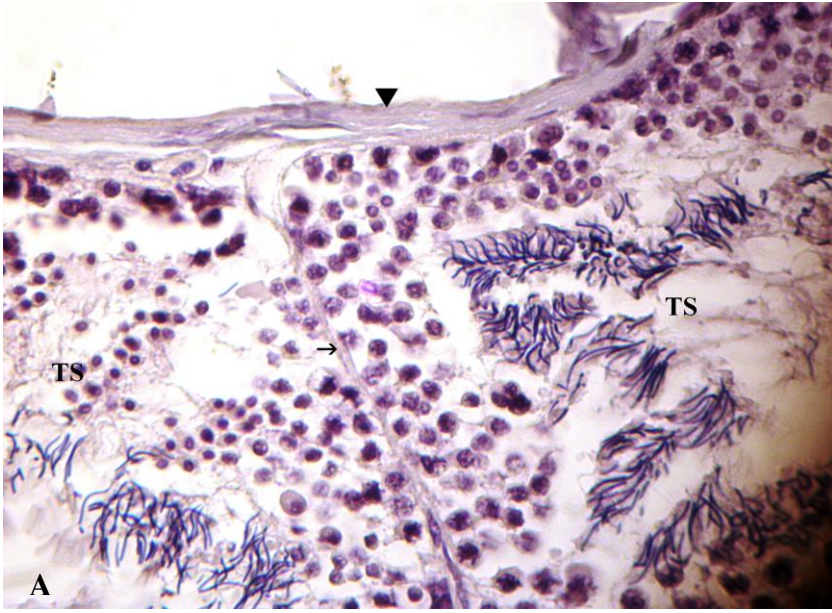
**Figura 34:** **A)** Fotomicrografia do epidídimo de *E. bilineatus*. Imunolocalização positiva para alfa-actina na camada de fibras musculares lisas, seguidas de tecido conjuntivo intersticial na parede do ducto epididimário (▼). Aumento de 1150x. **B)** Fotomicrografia do epidídimo de *U. vautieri*. Imunolocalização positiva para alfa-actina na cápsula (▼) e no músculo liso e tecido conjuntivo na parede das secções do ducto epididimário (→). Aumento de 630x.





**Figura 35:** A) Fotomicrografia do epidídimo de *E. perditus*. Imunolocalização positiva para desmina na cápsula e no tecido conjuntivo intersticial entre as secções do ducto epididimário (▼). Aumento de 630x. B) Fotomicrografia do epidídimo de *E. bilineatus*. Imunolocalização positiva no tecido conjuntivo intersticial entre as secções do ducto epididimário (▼). Aumento de 1150x.





**Figura 36:** Fotomicrografias dos testículos dos leiosaurídeos. A) *E. bilineatus*. Aumento de 1150x. B) *E. perditus*. Aumento de 630x. C) *U. vautieri*. Aumento de 630x. Imunorreação negativa para vimentina na cápsula testicular (▼), nos túbulos seminíferos (TS) e no tecido intersticial (→).

## 6.3 - DISCUSSÃO

### 6.3.1 - Estudo histológico dos testículos e epidídimos

A morfologia testicular dos lagartos *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* revela que estes apresentam um formato ovóide a alongado, resultado similar ao descrito em outros répteis (Orr, 1986; Hildebrand, 1995; Ferreira *et al.*, 2002; Pough *et al.*, 2003; Gribbins & Gist, 2003; Gribbins *et al.*, 2006; Gribbins *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Siegel *et al.*, 2009; Sever, 2010).

Estudos reprodutivos em Squamatas vêm associando as mudanças macroscópicas do aparelho reprodutor com mudanças microscópicas nas gônadas observadas com análises histológicas (Hondo *et al.*, 1997; Gribbins *et al.*, 2008; Gribbins, 2011; Hernández-Gallegos *et al.*, 2014).

Semelhante ao observado em outros lagartos por Vieira *et al.* (2001); Gribbins & Gist (2003) e Silva *et al.* (2016), os testículos dos lagartos analisados no presente estudo são envolvidos pela túnica albugínea.

No interior deste órgão encontram-se os túbulos seminíferos, entre os quais existe pouco tecido intersticial semelhante ao observado em *H. mabouia* (Silveira, 2009). Este tecido é composto por tecido conjuntivo no qual estão nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e as células intersticiais, ou de Leydig. Estas células secretam hormônios esteroides, como a testosterona (Mahmoud *et al.*, 1985) e são numerosas nas três espécies, semelhante ao observado em outra espécie de lagarto, por Vieira *et al.*, (2001), porém diferente ao descrito em um outro Squamata por Silveira (2009).

Nos répteis, o desenvolvimento e a função do epitélio seminífero estão intimamente relacionados com o desenvolvimento dos elementos somáticos do testículo (Russell *et al.*, 1994). Nos testículos dos lagartos *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* foi observado a presença de células da linhagem espermatogênica, de células somáticas (células de Sertoli), células mióides peritubulares e as células esteroidogênicas do interstício (células de Leydig ou intersticiais) com características similares às aquelas descritas para outros répteis e mamíferos (França *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2009; Kierszenbaum, 2012; Silva *et al.*, 2016).

De acordo com Gribbins (2011), em répteis as células de Sertoli são essenciais para a espermatogênese, processo este que inclui divisão celular por mitose e meiose que é seguida pela diferenciação final das células em espermatozoides, chamada espermiogênese. As células

de Sertoli nutrem as células germinativas, formam a barreira hematotesticular, fagocitam e digerem os corpos residuais liberados durante o processo da espermiogênese e secretam, continuamente, um fluido que é usado no transporte de espermatozoides (Norris & Jones, 2012).

A espermatogênese em lagartos, conforme descrito em estudos anteriores por Van Wyk, J.H. (1995), Gribbins *et al.*, (2014) e Rheubert *et al.*, (2014) pode ser dividida em quatro fases principais: quiescência, recrudescência, atividade máxima e regressão. A presença/ ausência de diferentes estágios das células da linhagem espermatogênica nos túbulos seminíferos, tamanho e morfologia das células de Sertoli e de Leydig podem ser utilizadas simultaneamente para caracterizar cada uma das várias etapas do ciclo testicular. Além disso, a presença e ausência de espermatozoides na luz dos ductos intra e extratesticular também ajuda na caracterização dos ciclos reprodutivos (Hernández-Gallegos *et al.*, 2014).

Apesar de ter sido observado no epitélio seminífero de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* a presença de células germinativas em todas as fases de maturação e de numerosos espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos não se pode afirmar que estes lagartos apresentam atividade espermatogênica contínua ao longo do ano, pois não foi possível fazer um acompanhamento prévio dos espécimes analisados para entender como é estabelecido o desenvolvimento temporal das células germinativas e a espermatogênese durante o período de um ano, como foi descrito para outras espécies de lagartos (Ferreira *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016). Além disso, em lagartos tropicais o ciclo reprodutivo de machos pode ser contínuo (durante todo o ano) ou descontínuo (sazonal), porém a espermatogênese sazonal é, de longe, o tipo mais comum de ciclo espermatogênico nestas espécies de répteis (Silva *et al.*, 2016).

Os epidídimos em *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri* são envolvidos por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo e o interstício do mesmo é composto por um tecido conjuntivo frouxo, conforme descrito em outro lagarto (Vieira *et al.*, 2001). No presente estudo foi observado que existem diferenças quanto ao diâmetro ao longo do comprimento deste órgão, semelhante ao descrito para *Flaviviridis mabouia* (Haider & Rai, 1987) e *Tropidurus itambere* (Ferreira *et al.*, 2009).

A parede do ducto epididimário, em *E. perditus* e *U. vautieri*, é revestida por um epitélio cilíndrico simples com vesículas secretoras, enquanto em *E. bilineatus* estas vesículas secretoras estão ausentes. Em *Lacerta vivipara* (Mesure *et al.*, 1991), *Podarcis sicula* (Desantis *et al.*, 2002), e *Seminatrix pygaea* (Sever, 2010) estas células secretoras também

foram observadas, mostrando que o epidídimo destes lagartos atua na secreção de diversas substâncias. Este resultado também é similar ao relatado em outros Squamatas (Dufaure & Saint Girons, 1984; Akbarsha *et al.*, 2006; Sever & Freeborn, 2012).

Gigon-Depeiges & Dufaure, (1977) afirmam que essas células secretoras presentes no epidídimo de alguns lagartos, podem desempenhar um importante papel na maturação dos espermatozoides, enquanto armazenados neste órgão. Diferente do que ocorre em cobras, nas quais os espermatozoides ficam armazenados no canal deferente (Fox, 1977).

### **6.3.2 - Imunolocalização de proteínas do citoesqueleto nos testículos e epidídimos**

Este trabalho demonstra a imunolocalização de microfilamentos de alfa-actina de músculo liso e filamentos intermediários de desmina em testículos e epidídimos de três espécies de leiosaurídeos: *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri*. Os microfilamentos (MFs) e filamentos intermediários (IFs) são conhecidos por ocorrerem numa variedade de células, nas quais formam padrões arquitetônicos variados, organizando e integrando o espaço celular (Lazarides, 1980; Geogartos, 1993; Zhu *et al.*, 1997). Em mamíferos, algumas destas proteínas podem ocorrer nos mesmos tipos celulares (Ramaekers *et al.*, 1985, Kasper & Stosiek, 1989; Dinges *et al.*, 1991; Wakui *et al.*, 1994).

A alfa-actina de músculo liso, nos três lagartos estudados, foi identificada em células contráteis ao longo da cápsula testicular. A função desta cápsula tem sido objeto de muitas especulações. Davis *et al.*, (1970) e Hargrove *et al.*, (1977) demonstraram em alguns mamíferos, a presença de células musculares lisas na cápsula, cuja contração pode auxiliar no transporte de espermatozoides (Davis *et al.*, 1970; Banks *et al.*, 2006). Estas células contráteis só recentemente foram descritas na túnica albugínea de aves, como na codorna japonesa (Van Nassauw *et al.*, 1993) e no galo doméstico (Maretta & Marettova, 2004).

A alfa-actina de músculo liso também foi verificada na cápsula testicular em aves, como codornas, no galo doméstico, no peru, no pato-real (Van Nassauw *et al.*, 1993, Maretta & Marettova, 2004; Aire & Ozegbe, 2007, 2008) e do mesmo modo em algumas espécies de mamíferos, como no rato (Palombi *et al.*, 1992), no macaco (Schlatt *et al.*, 1993), no touro (Abd-Elmaksoud, 2005), no coelho (Banks *et al.*, 2006) e em humano (Holstein *et al.*, 1996). A alfa-actina de músculo liso é principalmente, encontrada em células com funções contráteis



e, portanto, uma poderosa sonda no estudo de diferenciação das células musculares lisas em condições normais e patológicas (Skalli *et al.*, 1986; Van Nassauw *et al.*, 1993).

A parede dos túbulos seminíferos, nos leiosaurídeos estudados, é formada pelo epitélio seminífero, constituído por células espermatogênicas e células de Sertoli. Estes túbulos são envolvidos por tecido conjuntivo rico em fibroblastos e células mióides, que apresentam características de células musculares lisas, resultado semelhante ao descrito em outros répteis e em mamífero (Bock *et al.*, 1972; Hondo *et al.*, 1997; Junqueira & Carneiro, 2013).

As células peritubulares mióides, assim como células contráteis, expressam marcadores para microfilamentos de alfa-actina (Maekawa *et al.*, 1991) e para filamentos intermediários de desmina (Jezek *et al.*, 1996). Este tecido peritubular nos testículos, dos leiosaurídeos analisados, apresenta acentuada reação imuno-histoquímica para alfa-actina de músculo liso, do mesmo modo como observado em aves (Rothwell & Tingari, 1973; Aire, 2007) e em mamíferos (Steger & Wrobel, 1994; Maekawa *et al.*, 1996). A atividade destes filamentos é responsável pela contração dos túbulos seminíferos que resulta em movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozoides (Rossi *et al.*, 2002).

Nos epidídimos de *E. bilineatus*, *E. perditus* e *U. vautieri*, a alfa-actina de músculo liso foi observada, na cápsula de tecido conjuntivo e no interstício dos ductos dos epidídimos. Estes microfilamentos do citoesqueleto também foram observados no epidídimo de bovinos (Alkafafy, 2005) e no cão (Egger & Witter, 2009).

Os estudos imunohistoquímicos relacionados ao filamento intermediário desmina revelaram a presença deste, em diferentes intensidades na região da cápsula testicular, nos leiosaurídeos analisados. As reações variaram de moderada em *E. perditus* e *U. vautieri* a acentuada em *E. bilineatus*. A presença do FI desmina indica que provavelmente existem células contráteis na cápsula testicular. Resultado similar também observado em alguns mamíferos (Virtanen *et al.*, 1986; Paranko & Pelliniemi, 1992).

Estes resultados indicam que as células contráteis em diferentes regiões da cápsula testicular podem conter mais de um tipo de proteína do citoesqueleto, por exemplo, a presença de alfa-actina de músculo liso e desmina. De acordo com Georgatos (1993), algumas células possuem mais de um sistema de filamentos e microfilamentos, mas estes não se sobrepõem. Em seres humanos, as células semelhantes a fibroblastos na túnica albugínea são imunorreativas para a alfa-actina de músculo liso e vimentina, mas não para desmina, enquanto as células mióides são imunorreativas para todos os três tipos (Arenas *et al.*, 1997).

A imunolocalização para desmina, observada tanto na cápsula como no tecido muscular liso da parede dos ductos epididimários de *E. perditus* e *E. bilineatus*, também foi relatada em algumas espécies de aves (Hess *et al.*, 1976; Aire *et al.*, 2008). Em aves, o tecido que circunda os ductos dos epidídimos apresentam elementos contráteis, que são capazes de continuar o transporte do fluxo luminal de um segmento para o outro (Aire & Ozegbe, 2008). Deste modo, pode-se afirmar que as células contráteis participam da liberação dos espermatozoides dos túbulos seminíferos e seu movimento subsequente ao longo dos ductos do epidídimo dos leiosaurídeos.

Neste trabalho, pode-se afirmar que foi possível identificar, através da imunohistoquímica, a presença do MF alfa-actina de músculo liso e do FI desmina, tanto nos testículos, como nos epidídimos dos leiosaurídeos investigados, ao contrário dos resultados obtidos no cão (Wakui *et al.*, 1994) e no teleósteo *Gambusia affinis holbrooki* (Arenas *et al.*, 1995). Aire & Ozegbe (2007), afirmaram em ave que a presença destes MF e FI, nos testículos e epidídimos, constitui uma verdadeira força de propulsão, capaz de transportar rapidamente, através dos túbulos seminíferos e dutos dos epidídimos, o líquido testicular e os espermatozoides, provavelmente isto também ocorre em reptéis.

Nos três lagartos leiosaurídeos investigados, foi verificada a presença da alfa-actina de músculo liso e da desmina, tanto nos vasos sanguíneos da cápsula testicular e do epidídimo, como naqueles entre os tecidos intersticiais destes órgãos. É provável, que a presença destes elementos, nas células endoteliais dos vasos sanguíneos esteja relacionada à regulação do fluxo contínuo de sangue nos testículos e epidídimos. Resultados semelhantes foram descritos para estes órgãos em um peixe teleósteo (Dikranian *et al.*, 1993), e em algumas espécies de aves e mamíferos até o momento (Palombi *et al.*, 1992, Van Nassauw *et al.*, 1993; Steger & Wrobel, 1994; Holstein *et al.*, 1996; Maretta & Marettova, 2004; Abd-Elmaksoud, 2005; Banks *et al.*, 2006; Aire & Ozegbe, 2007).

A ausência de imunomarcção, de FI de vimentina, nos testículos e epidídimos nos lagartos pesquisados sugere que os componentes citoesqueléticos destes órgãos não reajam com os anticorpos utilizados, ou até mesmo, essa ausência seja justificada pela presença de outros componentes, que possam desempenhar algumas de suas funções, como a alfa-actina de músculo liso e a desmina. Existem inúmeros trabalhos relacionados à presença do FI vimentina em células de Sertoli (Van Vorstenbosch *et al.*, 1984; Miettinen *et al.*, 1985;

Rogatsch *et al.*, 1996), em células intersticiais testiculares (Miettinen *et al.*, 1985) e em tumores derivados do epitélio seminífero (Miettinen *et al.*, 1985; Rogatsch *et al.*, 1996).

Diferenças no conteúdo e expressão de MFs ou FIs também podem estar relacionadas com variações espécies-específicas em grau ou extensão em que os fibroblastos se diferenciam em músculo liso (Leeson & Forman, 1981; Wrobel *et al.*, 1988). Entre os mamíferos, a quantidade e distribuição de células musculares lisas variam de uma espécie para outra (Arenas *et al.*, 1997, Banks *et al.*, 2006). Banks *et al.*, (2006) também notaram que as diferenças observadas no conteúdo citoesquelético podem ser devidas à que uma célula muscular lisa não é uma entidade única, mas uma célula heterogênea, que expressa atividades contráteis e sintéticas, diferencialmente em extremos opostos do espectro.



#### 6.4 - CONCLUSÕES

- Os testículos das espécies analisadas são órgãos pares e encontram-se envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo com a presença de fibras musculares lisas, a túnica albugínea.
- A albugínea testicular apresenta septos que divide o órgão em lóbulos incompletos, delimitando os túbulos seminíferos, nos quais são produzidas as células da linhagem espermatogênica.
- Os epidídimos são os órgãos responsáveis pelo armazenamento dos espermatozoides em lagartos. Nos lagartos estudados, não é possível diferenciar este órgão em regiões, no entanto, observam-se ductos com diâmetros diferentes, revestidos por distintos epitélios.
- Os resultados imuno-histoquímicos indicam que os MF e FI variam em intensidade, nos testículos e epidídimos, entre as espécies de lagartos analisados.
- A alfa-actina de músculo liso e a desmina reagiram, na albugínea testicular e na cápsula do epidídimo, bem como nos tecidos que circundam os túbulos seminíferos, ductos do epidídimo e células endoteliais dos vasos sanguíneos.
- Não houve imunomarcagem para vimentina nos testículos e epidídimos nos lagartos analisados.

## 7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ELMAKSOU, A. 2005. Morphological, glycohistochemical, immunohistochemical studies on the embryonic and adult bovine testis. **Thesis, Institute of Veterinary Anatomy II, Faculty of Veterinary Medicine, LMU, Munich, Germany**
- ABD-ELMAKSOU, A. 2009. Comparative expression of laminin and smooth muscle actin in the testis and epididymis of poultry and rabbit. **J Mol Hist.** 40:407-416.
- AIRE, T. A., OZEGBE, P. C. 2007. The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. **J. Anat.** 210: 731-740.
- AIRE, T. A., OZEGBE, P. C. 2008. Immunohistochemistry of the cytoskeleton in the excurrent ducts of the testis in birds of the *Galloanserae* monophyly. **Cell Tissue Res.** 333: 311-321.
- AKBARSHA, M. A., KADALMANI, B., TAMILARASAN, V. 2006. Histological variation along and ultrastructural organization of the epithelium of the ductus epididymidis of the fan-throated lizard *Sitana ponticeriana* Cuvier. **Acta Zoologica.** 87:181-196.
- ALKAFIFY, M. 2005. Glycohistochemical, immunohistochemical and ultrastructural studies of the bovine epididymis. **Thesis, Institute of Veterinary Anatomy II, Faculty of Veterinary Medicine, LMU, Munich, Germany.**
- ANDREUCCETTI, P. 1992. An ultrastructural study of differentiation of pyriform cells and their contribution to oocyte growth in representative Squamata. **Journal of Morphology.** 212:1-11.
- ARENAS, M. I., FRAILE, B., DE MIGEL, M., PANIAGUA, R. 1995. Intermediate filaments in the testis of the teleost mosquito fish *Gambusia affinis holbrooki*: a light and electron microscope immunocytochemical study and Western blotting analysis. **Histochemical Journal.** 27: 329-337.
- ARENAS, M. I., BETENCOURT, F. R., FRAILE, B., PANIAGUA, R. 1997. Immunocytochemical and quantitative study of the tunica albuginea testis in young and ageing men. **Histochem Cell Biol.** 107: 469-477.
- BAKST, M. R. 1998. Structure of the avian oviduct with emphasis on sperm storage in poultry. **Journal of Experimental Zoology.** 282: 618-626.
- BANKS, F. C. L., KNIGHT, G. E., CALVERT, R. C., TURMAINE, M., THOMPSON, C. S., MIKHAILIDIS, D. P., MORGAN, R. J., BURNSTOCK, G. 2006. Smooth muscle and

- purinergic contraction of the human, rabbit, rat, and mouse testicular capsule. **Biol. Reprod.** 74: 473–480.
- BAROUDI, R. 1970. **Elementos da zoologia**. 6. ed. São Paulo: Nobel. p.125-152.
- BÉRNILS, R. S., GIRAUDO, A. R., CARREIRA S., CECHIN, S. Z. 2007. Répteis das porções subtropical e temperada da Região Neotropical. **Ciência & Ambiente**. 35: 101-136.
- BÉRNILS, R. S., BATISTA, M. A., Bertelli, P. W. 2001. Cobras e lagartos do Vale: levantamento das espécies de Squamata (Reptilia, Lepidosauria) da Bacia do Rio Itajai, Santa Catarina, Brasil. **Revista de estudos ambientais**. 3: 69-79.
- BÉRNILS, R. S., COSTA, H. C. (org.). 2012. Brazilian reptiles: List of species. Version 2012.1. Available at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**.
- BERTOLUCI, J., CANELAS, M. A. S., EISEMBERG, C. C., PALMUTI, C. F. S., MONTINGELLI, G. G. 2009. Herpetofauna of Estação Ambiental de Peti, an Atlantic Rainforest fragment of Minas Gerais State, southeastern Brazil. **Biota Neotrop.** 9(1).
- BETZ, T. W. 1963. The ovarian histology of the diamond-backed water snake. *Natrix rhombifera* during the reproductive cycle. **Journal of Morphology**. 113:245-260.
- BOCK, P., BREITTNECKER, G. LONGLMAYR, G. 1972. Kontraktile Fibroblasten (myofibroblasten) in der lamina propria der hodenkanalchen von Menchen. Zeitschrift fur Mikroskopisch. **Anatomische Forschung**. 133: 519-527.
- BORGES-NOJOSA, D. M., CARAMASCHI, U. 2004. Composição e análise comparativa da diversidade e afinidades biogeográficas dos lagartos e anfisbenídeos (Squamata) dos brejos nordestinos. In: Ecologia e Conservação da Caatinga. Editora Universitária da UFPE, Recife.
- BOTTE, V., ANGELINI, F. 1980. Endocrine control of reproduction in reptiles: the refractory period. In Delrio G, Brachet J, eds. **Steroids and Their Mechanisms of Action in Nonmammalian Vertebrates**. New York, Raven Press, 201-212.
- BOYD, M. M. M. 1940. The structure of the ovary and the formation of the corpus luteum in *Hoplodactylus maculatus*. **Q J Microsc Sci.** 82:337–376.
- CALLEBAUT, M., VAN NASSAUW, L. 1987. Demonstration by monoclonal antidesmin of a myoid tissue coat in the preovulatory ovarian tunica albuginea of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. **Med. Sci. Res.** 15: 1129-1130.



- COSTA, H. C., FERNANDES, V. D., RODRIGUES, A. C., FEIO, R. N. 2009. Lizards and Amphisbaenians, municipality of Viçosa, state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Check List**. 5:3:732-745.
- CHAPONNIER, C., GABBIANI, G. 2004. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. **J. Pathology**. 204:386-395.
- CZERNOBILSKY, B., MOLL, R., LEVY, R., FRANKE, W. W. 1985. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. **Eur. J. Cell Biol.** 37: 175–190.
- DAVIS, J. R., LANGFORD, G A. 1970. Pharmacological studies of the testicular capsule in relation to sperm transport. In the human testis (eds Rosenberg E, Paulsen CA), 495-514. New York: Plenum.
- DE PÉREZ, G., RAMÍREZ M. P., CALDERÓN M. L. 1999. Estudio preliminar de la ultraestructura de la pared del ovario y de folículos previtelogénicos y vitelogénicos tempranos de *Caiman crocodilus fuscus*. (Reptilia, Crocodylidae). **Rev. Acad. Colomb. Cienci.** 23: 453-464.
- DE PÉREZ, G., RAMÍREZ, M. P. 2002. El tracto reproductivo de la hembra en crocodylia: Estudio histológico y ultraestructural de *Caiman crocodilus fuscus* (Crocodylia: Alligatoridae) **Acta Biológica Colombiana**. 7:1:3-19.
- DESANTIS, S., LABATE, M., LABATE, G. M., CIRILLO, F. 2002 Evidence of regional differences in the lectin histochemistry along the ductus epididymis of the lizard, *Podarcis sicula* **Raf. Histochem J.** 34:123-130.
- DIKRANIAN, K., TROSHEVA, M., PETROV, M. 1993. Intermediate filaments and ATPase activity in the vascular wall of vertebrates. **Acta Histochem.** 94:13-9.
- DINGES, H. P., ZATLOUKAL, K., SCHMID, C., MAIR, S., WIRNSBEGER, G. 1991. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in rete testis and epididymis. **Virchows Archiv. A Path. Anat. Histopath.** 418:119-127.
- DIOKMETZIDOU, A., TSIKITIS, M., NIKOULI, S., KLOUKINA, I., TSOUPRI, E., PAPATHANASIOU, S. 2016. Chapter Fifteen-Strategies to Study Desmin in Cardiac Muscle and Culture Systems. **Methods in enzymology**. 568:427-459.
- DYCE, K. M., SACK, W. O., WENSING, C. I. G. 1997. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p. 645-647.

- DUFAURE, J., SAINT GIRONS, H. 1984. Histologie compare de l'epididyme et de ses secretions chez les reptiles (lezards et serpents). **Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale**.73:15–26.
- EGGER, G. F., WITTER, K. 2009. Peritubular contractile cells in testis and epididymis of the *Canis lupus familiaris*. **Acta Veterinaria Brno**.78:3-11.
- ELLENPORT, C.R. Aparelho urogenital geral. 1986. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.1813-1828.
- ETHERIDGE, R., WILLIAMS, E. E. 1991. A review of the South American lizard genera *Urostrophus* and *Anisolepis* (Squamata: Iguania: Polychridae). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**. 152:317-361.
- FRANÇA, L.R., SILVA, JR. V.A., CHIARINI-GARCIA, H., GARCIA S. K., DEBELJUK, L. 2000. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biol. Reprod**. 63:1629-1636.
- FERREIRA, A., LAURA, I. A., DOLDER, H. 2002. Reproductive cycle of male green iguanas, *Iguana iguana* (Reptilia: Sauria: Iguanidae), in the Pantanal of Brasil. **Brazilian Journal of Morphology Science**. 19:1:23-28.
- FERREIRA, A., SILVA, D. N., VAN SLUYS, M., DOLDER, H. 2009. Seasonal Changes in Testicular and Epididymal Histology of the Tropical Lizard, *Tropidurus itambere* (Rodrigues, 1987), during its Reproductive Cycle. **Brazilian Journal of Biology**. 69:2:429-435.
- FERREIRA, A.; KIHARA, V. O.; MEHANNA, M. 2011.Reproductive strategies of brazilian lizards of the genus *Tropidurus* Rodrigues, 1987 (Squamata, Tropiduridae) in temporal and spatial. **Int. J. Morphol**. 29:4: 1414-1421.
- FROST, D. R., ETHERIDGE, R., JAMES, D. E., TITTUS, T. A. 2001. Total evidence, sequence alignment, evolution of Polychrotid Lizards, and a reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). **Amer. Mus. Novitates**. 3343:1-38.
- FOX H. 1977. The urogenital system of the reptiles. In: Gans C. (Ed.), *Biology of Reptilia*. Academic Press, New York, p.1-127.
- GALOU, M., GAO, J., HUMBERT, J., MERICKSKAY, M., LI, Z., PAULIN, D., VICART, P. 1997. The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies. **Biology of Cell**. 89:85-97.

- GEISLER, N., KAUFMANN, E., WEBER, K. 1982. Proteinchemical characterization of three structurally distinct domains along the protofilament unit of desmin 10 nm filaments. **Cell**. 30:1: 277-286.
- GEOGARTOS, S. P. 1993. Dynamics of intermediate filaments: recent progress and unanswered questions. **FEBS**. 318:101-107.
- GIGON-DEPEIGES, A., DUFAURE, J. P. 1977. Secretory activity of the lizard epididymis and its control by testosterone. **General and Comparative Endocrinology**. 33:4:473-479.
- GOLDBERG, S. R. 1970. Seasonal ovarian histology of the viviparous iguanid lizard *Sceloporus jarrovi*. **Journal of Morphology**. 132:265-276.
- GOLDBERG, S. R. 1973. Ovarian cycle of the western fence lizard, *Sceloporus occidentalis*. **Herpetologica**. 29:284-289.
- GOLDMAN, R. D., KHUON, S., CHOU, Y. H., OPAL, P., STEINERT, P. M. 1996: The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. **J. Cell Biol.** 134: 971-983.
- GRIBBINS, K. M., GIST, D. H. 2003. Cytological evaluation of spermatogenesis within the germinal epithelium of the male european wall lizard, *Podarcis muralis*. **Journal of Morphology**. 258:296-306.
- GRIBBINS, K. M., GIST, D. H., CONGDON, J. 2003. Cytological evaluation of spermatogenesis in the red-eared slider. *Trachemys scripta*. **Journal of Morphology**. 255:337-346.
- GRIBBINS, K. M., ELSEY, R. M., GIST, D. H. 2006. Cytological evaluation of the germ cell development strategy within the testes of the American alligator, *Alligator mississippiensis*, **Acta Zoology**. 87:59-69.
- GRIBBINS, K. M., MILLS, E. M., SEVER, D. 2007. Ultrastructural examination of spermiogenesis within the testis of the ground skink, *Scincella laterale* (Squamata, Sauria, Scincidae), **Journal of Morphology**. 268:181-192.
- GRIBBINS, K., RHEUBERT, J., COLLIER, M., SIEGEL, D., SEVER, D. 2008. Histological analysis of spermatogenesis and the germ cell development strategy within the testis of the male western Cottonmouth Snake, *Agkistrodon piscivorus*. **Annals of Anatomy**. 190:461-476.
- GRIBBINS, K. M. 2011. Reptilian spermatogenesis: a histological and ultrastructural perspective. **Spermatogenesis**. 3:250–269.



- GRIBBINS, K. M., MATCHETT, C. L., DELBELLO, K. A., RHEUBERT, J., VILLAGRÁN-SANTACRUZ, M., GRANADOS-GONZÁLEZ, G., HERNÁNDEZ-GALLEGOS, O. 2014. The ultrastructure of spermatid development during spermiogenesis within the rosebelly lizard, *Sceloporus variabilis* (Reptilia, Squamata, Phrynosomatidae). **Journal of Morphology**. 275:258–268.
- GRIER, H. J., URIBE, M. C., LO NOSTRO, F. L., MIMS, S. D., PARENTI, L. R. 2016. Conserved form and function of the germinal epithelium through 500 million years of vertebrate evolution. **Journal of Morphology**. 277:8:1014-44.
- GÓMEZ, D., RAMÍREZ-PINILLA, M. P. 2004. Ovarian Histology of the Placentotrophic *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). **Journal of Morphology** 259:90-105.
- GURAYA, S. S. 1989. Ovarian follicles in reptiles and birds. **Springer-Verlag, Berlin**: 287 p.
- HAHN, W. E. 1964. Seasonal changes in testicular and epididymal histology and spermatogenic rate in the lizard *Uta stansburiana stejnegeri*. **Journal of Morphology**. 115:3:447-459.
- HAMMOUCHE, S., GERNIGON, T., EXBRAYAT, J. M. 2009. Correlation between ovarian steroidogenesis and beta-endorphin in the Lizard *Uromastyx acanthinura*: Immunohistochemical approach. **Folia Histochem Cytobiol**. 47:5:S95-S100.
- HARGROVE, J. L., MACINDOE, J. H., ELLIS, L.C. 1977. Testicular contractile cells and sperm transport. **Fertil Steril**. 28:146-1157.
- HECKMANN, M., BAUER, R., JUNGSMANN, A., WINTER, L., RAPTI, K., STRUCKSBERG, K. 2016. AAV9-mediated gene transfer of desmin ameliorates cardiomyopathy in desmin-deficient mice. **Gene therapy**. 23:8-9:673-9.
- HELFAND, B. T., CHANG, L., GOLDMAN, R. D. 2003. The dynamic and motile properties of intermediate filaments. **Annual Review of Cell Developmental Biology**. 19:445-467.
- HELFAND, B., CHANG, L., GOLDMAN, R. 2004. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. **Cell science**. 117:2:133-141.
- HENDERSON, D., WEBER, I. C. 1980. Immunoelectron microscopic studies of intermediate filaments in culture cells. **Expl Cell Res**. 129:441-53.
- HESS, R. A., THURSTON, R. J., BIELLER, H. V. 1976. Ultrastructure of the epididymal region and ductus deferens of the turkey (*Meleagris gallopavo*). **J. Anat**. 122:241-252.

- HERRMANN, H., HESSE, M., REICHENZELLER, M., AEBI, U. 2003. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. **Int Rev Cytol.** 223:83-175.
- HERRMANN, H., AEBI, U. 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds, **Annu Rev Biochem.** 73:749-89.
- HERNÁNDEZ-GALLEGOS O., MÉNDEZ-DE LA CRUZ, F.M. R., VILLAGRÁN-SANTACRUZ, M., RHEUBERT, J. L., GRANADOS-GONZÁLEZ, G., GRIBBINS, K. M. 2014. Seasonal spermatogenesis in the Mexican endemic oviparous lizard, *Sceloporus aeneus* (Squamata: Phrynosomatidae). **Spermatogenesis.** 4:3: 988585.
- HERNÁNDEZ-FRANYUTTI A., URIBE ARANZÁBAL M. C., GUILLETTE L. J. JR. 2005. Oogenesis in the viviparous matrotrophic lizard *Mabuya brachypoda*. **Journal of Morphology** 265:152-164.
- HILDEBRAND, M. **Análise da estrutura dos vertebrados.** São Paulo: Atheneu, 1995. p. 700.
- HINZ, B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **J Invest Dermatol.** 127:526-537.
- HOLSTEIN, A. F., MAEKAWA, M., NAGANO, T. 1996. Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. **Arch Histol Cytol.** 59:109-125
- HONDO, E., KITAMURA, N., TORIBA, M., KUROHMARU, M., HAYASHI, Y., YAMADA, J. 1997. Histological study of the seminiferous epithelium in the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*: identification of spermatogonium. **Journal of Veterinary Medical Science** 59:23-29.
- HUBERT, J. 1985. Origin and development of oocytes. In: Gans C, editor. **Biology of the Reptilia.** New York: John Wiley & Sons. 14:41-74.
- IVASKA, A. J., PALLARIB, H-M., NEVOA, J., ERIKSSON, J. E. 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Exp Cell Res.** 313:10:2050-62.
- JACKSON, J. F. 1978. Differentiation in the genera *Enyalius* and *Strobilurus* (Iguanidae): implications for Pleistocene climatic changes in eastern Brazil. **Arquivos de Zoologia.** 30: 1-40.

- JEZEK, D., HITTMAIR, A., ROGATSCH, H. 1996. Lamina propria of sex cords in human fetal testis: an immunohistological and stereological study. **Anatomy and Embryology**. 193:181-190.
- JONES, R. E. 1987. Ovulation: insights about the mechanisms based on a comparative approach. En D. O. Norris, R. E. Jones (eds.). **Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles**, 203-240. New York: Plenum Press.
- JONES, R. E., SWAIN, T., GUILLETTE, L. J., FITZGERALD, K. T. 1982. The comparative anatomy of lizard ovaries, with emphasis on the number of germinal beds. **J Herpetol** 16:240-252.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. 2013. **Histologia Básica**. 12<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 538p.
- KABSCH, W., VANDEKERCKHOVE, J. 1992. Structure and function of actin. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**. 21:49-76.
- KASPER, M., P. STOSIEK. 1989. Immunohistochemical investigation of different cytokeratins and vimentin in the human epididymis from the fetal period up to adulthood. **Cell Tissue Res**. 257:661-664.
- KHAN-DAWOOD, F. S., DAWOOD, M. Y., TABIBZADEH, S. 1996. Immunohistochemical analysis of the microanatomy of primate ovary. **Biol. Reprod**. 54:734-742.
- KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular - uma introdução à patologia**. 3<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 704p.
- KINNER, B., ZALESKAS, J. M., SPECTOR, M. 2002. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. **Exp Cell Res**. 278:72-83.
- KLOSTERMAN, L. L. 1983. The ultrastructure of germinal beds in the ovary of *Gerrhonotus coeruleus* (Reptilia: Anguinae). **Journal of Morphology**. 178:247-266.
- LAZARIDES, E. 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. **Nature** 283:249-256.
- LAZARIDES, E. 1982. Biochemical and immunocytological characterization of intermediate filaments in muscle cells. **Methods Cell Biol**. 25:333-57.
- LEESON, C. R., FORMAN, D. E. 1981. Postnatal development and differentiation of contractile cells within the rabbit testis. **J Anat**. 132: 491-511.



- LYALL, F., ROBSON, S. C., BULMER, J. 2013. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction relationship to clinical outcome. **Hypertension**. 2:6:1046-1054.
- LIANG, G., LIU, Q., YU, H., WANG, Q. 2011. Histological and immunocytochemical study of deferens ducts in the Chinese rat snake (*Zaocys dhumnades*). **Zoological Research**. 329:6:663-669.
- LIMA, A. F. B., SOUSA, B. M. 2006. Court and copulation behaviors of *Enyalius perditus* Jackson, 1978 (Squamata, Leiosauridae) in captivity conditions. **Revista Brasileira De Zoociências**. 8:2:193-197.
- LOREDANA, R., VACCARO, M. C., PRISCO, M., CAROTENUTO, R., LIGUORO, A., ANDREUCETTI, P. 2004. a and b Spectrin distribution during the differentiation of pyriform cells in follicles of lizard *Podarcis sicula*. **Molecular Reproduction and Development**. 67:101-107.
- LOURENÇO, L. 2008. Protocolos de rotina do laboratório de histologia e anatomia patológica. **UTAD**. Ed, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro. Vila Real.
- LUNA, E. J., HITT, A. L. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. **Science**. 258: 955-963.
- MACHADO-SANTOS, C., SANTANA, L. N. S., VARGAS, R. F. G., ABIDU-FIGUEIREDO, M., BRITO-GITIRANA, L., CHAGAS, M. A. 2015. Histological and immunohistochemical study of the ovaries and oviducts of the juvenile female of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Zoologia (Curitiba)* [online]. 32:5: 395-402.
- MADEKUROZWA, M. C., KIMARO, W. H. 2006. A morphological and immunohistochemical study of healthy and atretic follicles in the ovary of the sexually immature ostrich (*Struthio camelus*). **Anat. Histol. Embryol**. 35: 253-258.
- MADEKUROZWA, M. C. 2007. An immunohistochemical study of the distribution of intermediate filaments in the ovary of the emu (*Dromaius novaehollandiae*). **Anat. Histol. Embryol**. 36: 336-342.
- MAEKAWA, M., NAGANO, T., KAMIMURA, T., ISHIKAWA, H., DEZAWA, M. 1991. Distribution of actin-filament bundles in myoid cells, Sertoli cells, and tunica albuginea of rat and mouse testes. **Cell Tissue Res** 266: 295–300.
- MAHMOUD, I. Y., CYRUS, R. V., BENNETT, T. M., WOLLER, M. J., MONTAG, D. M. 1985. Ultrastructural changes in testes of the snapping turtle, *Chelydra serpentina* in

- relation to plasma testosterone,  $\Delta$  5-3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, and cholesterol. **General and comparative endocrinology**, 57:3:454-464.
- MANES, M. E., NORIEGA, T., CASAL, F. C., APICHELA, S. 2007. Ovarian changes during the reproductive cycle of the *Tupinambis merianae* lizard raised in a temperate environment. **Cuadernos de Herpetologia** 21: 21-29.
- MARETTA, M., MARETTOVA, E. 2004. Immunohistochemical demonstration of myoid cells in the testis and its excurrent ducts in the domestic fowl. **Br Poultry Sci** 45: 585–589.
- MARETTOVA, E., MARETTA, M. 2002. Demonstration of intermediate filaments in sheep ovary. **Acta Histochemica**, 104:431-434. M
- MAURIZII, M. G., TADDEI, C. 1996. Immunolocalization of cytoskeletal proteins in the previtellogenic ovarian follicle of the lizard *Podarcis sicula*. *Cell Tissue*. 284:489-493.
- MENDES, R. M. M., PINHEIRO, N. L., NASCIMENTO, A. A., SANTOS, C. M., RIBEIRO, T. P., SANTOS, M. A. J., SALES, A. 2009. Histologia comparada de testículo e do segmento sexual do rim de lagarto tropical *Tropidurus torquatus* Wied, 1820 (Squamata: Tropiduridae) adultos e imaturos. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*. 29:49-54.
- MESURE, M., CHEVALIER, M., DEPEIGES, A., FAURE, J., DUFAURE, J. P. 1991. Structure and ultrastructure of the epididymis of the viviparous lizard during the annual hormonal cycle: Changes of the epithelium related to secretory activity. **J Morphol** 210:133–145.
- MIETTINEN, M., VIRTANEN, I., TALERMAN, A. 1985. Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ cell tumours. **Am. J. Pathol.** 120: 402-10.
- MOODLEY, G. K., VAN WYK, J. H. 2007. Folliculogenesis and ovarian histology of the oviparous gecko, *Hemidactylus mabouia* (Sauria: Gekkonidae). **African Journal of Herpetology** 56: 115-135.
- MOORE, R., CLARK, D., VODOPICH, D. S. 1998 - **Botany** - McGraw-Hill Education, 832 p.
- MOTTA, C. M., CASTRIOTA-SCANDERBEG, M., FILOSA, S., ANDREUCCETTI, P. 1995. Role of pyriform cells during the growth of oocytes in the lizard *Podarcis sicula*. **J Exp Zool** 273:247–256.

- MOTTA, C. M., FILOSA, S., ANDREUCCETTI, P. 1996. Regression of the epithelium in the late previtellogenic follicles of *Podarcis sicula*: a case of apoptosis. **J Exp Zool** 276:233–241.
- MCHUGH, K. M., CRAWFORD, K., LESSARD, J. L. 1991. A Comprehensive Analysis of the Developmental and Tissue-Specific Expression of the Isoactin Multigene Family in the Rat. **Developmental Biology** 148:442-458.
- NEAVES, W. B. 1971. Intercellular bridges between follicle cells and oocyte in the lizard *Anolis carolinensis*. **Anat Rec** 170: 285–302.
- NOBLE, G. A., NOBLE, E. R. 1940. A brief anatomy of turtle. Stanford University Press, Stanford University California. **London: Hamphrey Oxford University Press**, 49p.
- NORRIS, D. O., JONES, R. E. 2012. **Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles**. Springer Science & Business Media. 613 p.
- ORR, R. T. **Biologia dos vertebrados**. 5. ed. São Paulo: Livraria Rocca Ltda., 1986. p. 508.
- ORTEGA, H. H., SALVETTI, N. R., MÜLLER, L. A., AMABLE, P., LORENTE, J. A., BARBEITO, C. G., GIMENO, E. J. 2007. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease. **Journal of comparative pathology**, 136:4: 222-230.
- O'SHEA, J., ROBSON, R., HARTZER, M., HUIATT, T., RATHBUN, W., STROMER, M. 1981. Purification of desmin from adult mammalian skeletal muscle. **Biochemical Journal**, 195:2: 345-356.
- OZEGBE, P. C., KIMARO, W., MADEKUROZWA, M. C., SOLEY, J. T., AIRE, T. A. 2010. The Excurrent Ducts of the Testis of the Emu (*Dromaius novaehollandiae*) and Ostrich (*Struthio camelus*): Microstereology of the Epididymis and Immunohistochemistry of its Cytoskeletal Systems. **Anat. Histol. Embryol.** 39:7–16.
- PALOMBI, F., FARINI, D., SALANOVA, M. DE GROSII, S., STEFANIN, M. 1992. Development and cytodifferentiation of peritubular myoid cells in the rat testis. **Anatomical Record**, 233: 32-41.
- PARANKO, J., PELLINIEMI, L. J. 1992. Differentiation of smooth muscle cells in the fetal rat testis and ovary: localization of alkaline phosphatase, smooth muscle myosin, F-actin, desmin. **Cell Tissue Res** 268: 521–530
- PAULIN, D., LI, Z. 2004. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. **Exp. Cell Res.** 301: 1–7.



- PFEIFFER, D. C., VOGL, A.W. 1992. Actin filaments associated with the basal Sertoli cell surface in the alligator and turtle. **Tissue Cell**. 24:5:643-54.
- PELLINIEMI, L. J., KUOPIO, T., FROJDMAN, K. 1996. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. **The Leydig cell. Cache River Press, Vienna, IL**, 143-158.
- PERRY, M. M., GILBERT, A. B., EVANS, A. J. 1978. Electron microscope observations on the ovarian follicle of the domestic fowl during the rapid growth phase. **Journal of Anatomy**, 125:481-497.
- PIRES, M., COELHO, A. C., PALMEIRA, C., CARDOSO, M. N., SEIXAS, F., RODRIGUES, J. 2010. **Protocolos de Imunologia**. 49-55.
- POUGH, F. H.; JANIS, M. C.; HEISER, B. J. 2003. **A vida dos vertebrados**. 3. ed. São Paulo: Atheneu. p. 270-290.
- RAMAEKERS, F. C. S., FEITZ, W., MOESKE, O., SCHAART, G., HERMAN, C., DEBRUYNE, F., VOOIJES, G. P. 1985. Antibodies to cytokeratin and vimentin in testicular tumour diagnosis. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.* 408: 127-142.
- RAMÍREZ-PINILLA, M. P., DE PÉREZ, G., RAMÍREZ-PERILLA, J. 1989. Histologia del tracto reproductivo de la hembra del lagarto *Phenacosaurus heterodermus* (Reptilia: Sauria: Iguanidae). **Trianea** 3: 93–103.
- RAHIL, K. S. E NARBAITZ, R. 1973. Ultrastructural studies in the relationship between follicular cells and growing oocytes in the turtle *Pseudemys scripta*. **Journal of Anatomy** 115:175-186.
- RAUCCI, F., DI FIORE, M. M. 2010. The maturation of oocyte follicular epithelium of *Podarcis s. sicula* is promoted by d-aspartic acid. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 58:2:157-171.
- REDMER, D. A., V. DORAISWAMY, B. J. BORTNEM, K. FISHER, A. JABLONKA-SHARIFF, A. T. GRAZUL-BILSKA, L. P. REYNOLDS. 2001. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. **Biol. Reprod.** 65: 879–889.
- RIBEIRO, L. B., SOUSA, B. M. 2006. *Urostrophus vautieri* (NCN). Skin shedding. **Herpetological Review** 37:3: 348.
- RODRIGUES, M. T., FREITAS, M. A., SILVA, T. F. S., BERTOLOTTI, C. E. V. 2006. A new species of lizard genus *Enyalius* (Squamata: Leiosauridae) from the highlands of Chapada Diamantina, state of Bahia, Brazil, with a key to species. *Phyllomedusa*, 5: 11-24.

- ROGATSCH, H., JEZEK, D., HITTMAYER, A., MICUZ, G., FEICHTINGER, H. 1996. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. **Virchows Arch A Pathol Anat** 427:497-502.
- ROSSI, F., FERRARESI, A., ROMAGNI, P., SILVESTRONI, L., SANTIEMMA, V. 2002. Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro. **Endocrinology**. 143:8: 3096-3104.
- ROTHWELL, B., SOLOMON, S. E. 1977. The ultrastructure of the follicle wall of the domestic fowl during the phase of rapid growth. **British Poultry Science**, 18: 605-610.
- ROTHWELL, B., TINGARI, M. D. 1973. The ultrastructure of the boundary tissue of the seminiferous tubule in the testis of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **J Anat** 114: 321-328.
- RHEUBERT, J. L., TOUZINSKY, K., SEVER, D. M., ALDRIDGE, R. D., WILMES, A. J., SIEGEL, D. S., GRIBBINS, K. M. 2014. Reproductive Biology of *Sceloporus consobrinus* (Phrynosomatidae): Male Germ Cell Development and Reproductive Cycle Comparisons within Spiny Lizards. **Journal of Herpetology**. 48:2:162-17.
- RUSSEL, L. D., SINHA-HIKIM, A. P., GHOSH, S., BARTKE, A. 1994. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE A. (eds). **Function of somatic cells in the testis**. Norwell: Spring-Verlag. p55-83.
- SADJIA, H., GERNIGON SPYCHALOWICZ, T., EXBRAYAT, J. M. 2007. Immunolocalization of estrogens and progesterone receptors within the ovary of the lizard *Uromastix acanthinura* from vitellogenesis to rest season. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. 45: 23-27.
- SANDLEIR, R. M. F. S. 1973. The reproduction of vertebrates. **New York: Academic press**. p. 56-59.
- SANTOS, R. C., LUCAS, P. S., SOUSA, B. M., NOVELLI, I. A. 2009. Reptilia, Squamata, Leiosauridae, *Urostrophus vautieri*: Distribution extension and geographic distribution map. **Check List**. 5:3: 533-536.
- SANTOS, H. S. *et al.* 2015. Ovarian follicular cycle of *Tropidurus hispidus* and *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata: Tropiduridae) in a semiarid region of Brazil. **Zoologia**. 32:1: 86-92.

- SAZIMA, I., HADDAD, C. F. B. 1992. Répteis da Serra do Japi: notas sobre história natural. In História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil. (P. Morellato, org.). **Editora da UNICAMP**, Campinas, 212-235.
- SCHAFFELD, M., HERRMANN, H., SCHULTESS, J., MARKL, J. 2001. Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: sequence, expression patterns and in vitro assembly. **Eur J Cell Biol.** 80: 692-702.
- SCHLATT, S., WEINBAUER, G. F., ARSLAN, M., NIESCHLAG, E. 1993. Appearance of  $\alpha$ -smooth muscle actin in peritubular cells of monkey testes is induced by androgens, modulated by follicle-stimulating hormone, and maintained after hormonal withdrawal. **J Androl.** 14: 340-350
- SELSTAM, G., I. NILSSON, AND M. O. MATTSSON. 1993. Changes in the ovarian intermediate filament desmin during the luteal phase of the adult pseudopregnant rat. **Acta Physiol. Scand.** 147: 123-129.
- SEVER D. M. 2010. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). VI. Anterior testicular ducts and their nomenclature. **Journal of Morphology.** 271:104-115.
- SEVER, D. M., FREEBORN, L. R. 2012. Observations on the anterior testicular ducts in snakes with emphasis on sea snakes and ultrastructure in the yellow-bellied sea snake, *Pelamis platurus*. **Journal of Morphology.** 273: 324-336.
- SIEGEL, D. S., SEVER, D. M., RHEUBERT, J. L., GRIBBINS, K. M. 2009. Reproductive biology of *Agkistrodon piscivorus* Lacépède (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae) **Herpetol Monographs.** 23:74-107.
- SINGH, D. K., MOHANTY, N., JENA, N. 2016. Reproductive cycle of male common Indian rock lizard, *Psammophilus blanfordanus*: Seasonal testis, epididymis and renal sex segment histology. **The Journal of Zoology Studies**, 3:6: 45-55.
- SILVA, D., RODRIGUES, M., MEHANNA, M., FERREIRA, A., DOLDER, H. 2016. Células germinativas e espermatogênese do lagarto *Tropidurus torquatus* (Tropiduridae) de uma área urbana no bioma cerrado do centro-oeste brasileiro. **Bioscience Journal.** 32:6:1595-1603.
- SILVEIRA, J. A. 2009. Histologia testicular e caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero de *Hemidactylus mabouia*, (Moreau De Jonnés, 1818) (Reptilia, Squamata,



- Sauria, Gekkonidae). **Dissertação (mestrado em biologia celular e estrutural)**. Universidade Federal De Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 60p.
- SKALLI, O., ROPRAZ, P., TRZECIAK, A., BENZONANA, G., GILLESSEN, D., GABBIANI, G. 1986. A monoclonal antibody against -smooth muscle actin: A new probe for smooth muscle differentiation. **J Cell Biol.** 103:2787-2796.
- SOUSA, B. M. 2000. Aspectos ecológicos, comportamentais e morfológicos associados à alimentação de *Enyalius perditus* Jackson, 1978 (Sauria: Polychrotidae). **Tese de doutorado**, UFRRJ, 168p.
- STEGER, K., WROBEL, K. H. 1994. Immunohistochemical demonstration of cytoskeletal proteins in the ovine testis during postnatal development. **Anatomy and Embryology.** 189: 521-530.
- STORER, T. I., USINGER, R. L., STEBBINS, R. C., NYBAKKEN, J. W. 2000. **Zoologia geral.** 6 ed. v. 8. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p. 642-654.
- TAYLOR, C. 2014. Predictive Biomarkers and Companion Diagnostics. The Future of Immunohistochemistry - 'in situ proteomics', or just a 'stain'? **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** 22:8: 555-561.
- TEIXEIRA, R. L., ROLDI, K., VRCIBRADIC, D. 2005. Ecological Comparisons between the Sympatric Lizards *Enyalius bilineatus* and *Enyalius brasiliensis* (Iguanidae, Leiosaurinae) from an Atlantic Rain-Forest Area in Southeastern Brazil. **Journal of Herpetology.** 39:3: 504-509.
- TUMKIRATIWONG, P., MEESUK, W., CHANHOME, L., AOWPHOL, A. 2012. Reproductive patterns of captive male and female monocle cobra, *Naja kaouthia* (Lesson, 1831). **Zoological Studies.** 51:5: 692-700.
- UETZ, P., JIRÍ HOŠEK (eds.), The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, acessado em abril, 2017.
- URIBE, M. C., OMANA, M. E. M., QUINTERO, J. E. G., GUILLETTE, L. J. JR. 1995. Seasonal variation in ovarian histology of the viviparous lizard *Sceloporus torquatus torquatus*. **Journal of Morphology** 226:103-119.
- URIBE, M. C., PORTALES, G., GUILLETTE, L. J. JR. 1996. Ovarian folliculogenesis in the oviparous Mexican lizard *Ctenosaura pectinata*. **Journal of Morphology.** 230: 99-112.
- URIBE, M. C. A., GUILLETTE, L. J. 2000. Oogenesis and ovarian histology of the American alligator *Alligator mississippiensis*. **Journal of Morphology.** 245:3:225-240.

- VAN DEN HURK, R., G. DIJKSTRA, F. N. VAN MIL, S. C. J. HULSHOF, AND S. G. A. M. 1995. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin and desmin in the bovine ovary. **Mol. Reprod. Dev.** 41: 459-467.
- VAN NASSAUW, L., CALLEBAUT, M., HARRISSON, F., DANEELS, G., MOEREMANS, M. 1989. Immunohistochemical localization of desmin in the quail ovary, demonstration of a suspensory apparatus. **Histochemistry.** 90: 371-377.
- VAN NASSAUW, L., CALLEBAUT, M. 1991. Structural and immunohistochemical aspects of the postovulatory follicle in Japanese quail. **Anatomical Records.** 229: 27-30.
- VAN NASSAUW, L., F. HARRISSON, CALLEBAUT, M. 1991: Localization of smooth-muscle markers in the ovaries of some ectothermic vertebrates. **Anatomical Records.** 229: 439-446.
- VAN NASSAUW, L., HARRISSON, F., CALLEBAUT, M. 1992. Immunolocalization of smooth muscle-like cells in the quail ovary. **European Journal of Morphology.** 30: 275-288.
- VAN NASSAUW, L., CALLEBAUT, M., HARRISSON, F., SCHEUERMANN, D. W. 1992. Smooth muscle cells in the walls of ovarian follicles in the *Japanese quail*. **Cell Tissue Res.** 269: 49-56.
- VAN NASSAUW, L., HARRISON, F., CALLEBAUT, M. 1993. Smooth muscle cells in the peritubular tissue of the quail testis. **European Journal of Morphology.** 31: 60-64.
- VAN VORSTENBOSCH, C. J., SPEK, E., COLENBRANDER, B., WENSING, C. J. 1984. Sertoli cell development of pig testis in the fetal and neonatal period. **Biol. Reprod.** 31: 565-77.
- VAN WYK, J. H. 1984. Ovarian morphological changes during the annual breeding cycle of the rock lizard *Agama atra* (Sauria: Agamidae). Navorsinge van die Nasionale Museum Bloemfontein, **Bloemfontein.** 4: 237-275.
- VAN WYK, J. H. 1995. The male reproductive cycle of the lizard *Cordylus giganteus* (Sauria: Cordylidae). **J. Herpetol.** 29: 522-535.
- VIEIRA, G.H.C., WIEDERHECKER, H.C., COLLI, G.R., BAO, S.N. 2001. Spermiogenesis and testicular cycle of the lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae) in the Cerrado of central Brazil. **Amphibia-Reptilia.** 22: 217- 223.

- VIEIRA, S., ROMERO DE PEREZ, G., RAMÍREZ-PINILLA, M. P. 2010. Ultrastructure of the ovarian follicles in the placental Andean Lizard of the genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). **Journal of Morphology**. 271:6:738-749.
- VIRTANEN, I., KALLAJOKI, M., NARVANEN, O., PARENKO, J., THORNELL, L.E., MIETTINEN, M., LEHTO, V.P. 1986. Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. **Anatomical Record**. 215:10-20.
- VITT, L. J., ÁVILA-PIRES, T. C. S., ZANI, P. 1996. Observations on the ecology of the rare Amazonian lizard *Enyalius leechii* (Polychrotidae). **Herpetological Natural History**. 4:77-82.
- WAKUI, S., M. FURUSATO, S. USHIGOME, Y. KANO, 1994. Co-expression of different cytokeratins, vimentin and desmin in the rete testis and epididymis in the dog. **Journal of Anatomy**. 184:147-151.
- WROBEL, K-H., DOSTAL, S., SCHIMMER, M. 1988. Postnatal development of the tubular lamina propria and the intertubular tissue in the bovine testis. **Cell Tissue Res**. 252: 639-653.
- YOKOI, Y., NAMIHISA, T., KURODA, H., KOMATSU, I., MIYAZAKI, A., WATANABE, S., USUI, K. 1984. Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). **Hepatology**. 4: 709-14.
- YOSHIMURA, Y., TANAKA, K., KOGA, O. 1983. Studies on the contractility of follicular wall with special reference to the mechanism of ovulation in hens. **British Poultry Science**. 24: 213-218.
- ZAMPROGNO, C., ZAMPROGNO, M. G. F., TEIXEIRA, R. L. 2001. Evidence of terrestrial feeding in the arboreal lizard *Enyalius bilineatus* (Sauria, Polychrotidae) of South-Eastern Brazil. **Rev. Bras. Biol**. 61: 91-94.
- ZATZ, M. G. 2002. O polimorfismo cromático e sua manutenção em *Enyalius sp* (Squamata: Leiosauridae) no Cerrado do Brasil Central. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- ZHU, L. J., S. D. ZONG, D. M. PHILLIPS, A. J. MOO-YOUNG, C. W. BARDIN, 1997. Changes in the distribution of intermediate filaments in the rat Sertoli cells during the seminiferous epithelium cycle and postnatal development. **Anat. Rec**. 248: 391-405.
- ZUG, G. R., VITT, L. J., CALDWELL, J. P. 2001. **Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles**. Academic Press: New York. 3rd ed. 697 p.