

Espermio gênese em *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): aspectos ultra-estruturais

Rodrigo Zieri¹, Sebastião R. Taboga² & Classius de Oliveira²

- 1 Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, R. Cristóvão Colombo 2265, Jd. Nazareth, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil. (rodrigozieri@yahoo.com.br)
2. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Departamento de Biologia, R. Cristóvão Colombo 2265, Jd. Nazareth, 15054-000. (classius@ibilce.com.br)

ABSTRACT. Spermogenesis in *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): ultrastructural aspects. Spermatozoon maturation involves an extense and complex process beginning with proliferation and differentiation of spermatogonia, passing through meiosis, and ending with spermiogenesis. The later event involves morphological and biochemical changes in order to transform spermatids into spermatozoa. Ultrastructural aspects of the spermiogenesis and testicular spermatozoa of the anuran *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863) were analyzed by transmission electron microscopy. Spermogenesis involves chromatin condensation and nuclear elongation, with visible cytoplasmic elimination. At this stage, a large amount of microtubules and glycogen can also be seen in Sertoli cell cytoplasm, surrounding each spermatid. The spermatozoon is fusiform and the acrosome forms a cap in the anterior region of the nucleus. A mitochondrial sleeve is found around the proximal portion of the tail. The tail presents an axonema with a 9+2 pattern, a justaxonemal fiber, an undulating membrane, and the absence of axial rod. This organization shows some similarities with species of the genus *Physalaemus* (Leiuperidae) such as *P. biligonigerus* (Cope, 1861), *P. gracilis* (Boulenger, 1883) and *P. fuscomaculatus* (Steindachner, 1864).

KEYWORDS. Anura, *Eupemphix nattereri*, ultrastructure, spermiogenesis, spermatozoon.

RESUMO. A maturação dos espermatozoides envolve um extenso e complexo processo que começa com a proliferação e diferenciação das espermatogônias, passa pela meiose e finaliza com a espermio gênese. Nessa fase, eventos envolvendo alterações morfológicas e bioquímicas transformam espermátides em espermatozoides. Aspectos ultra-estruturais da espermio gênese e do espermatozoide do anuro *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863) foram analisados através de microscopia eletrônica de transmissão. A espermio gênese envolve condensação da cromatina e alongamento nuclear, com visível eliminação de citoplasma. Nesse estágio, grande quantidade de microtúbulos e glicogênio podem ser visualizados no citoplasma das células de Sertoli, rodeando cada espermátide. O espermatozoide é fusiforme e o acrossomo forma uma capa na região anterior do núcleo. A bainha mitocondrial é encontrada ao redor da porção proximal da cauda. A cauda apresenta o axonema com o modelo 9+2, uma fibra axonemal, a membrana ondulante e ausência de bastão axial. Esta organização apresenta algumas similaridades com espécies do gênero *Physalaemus* (Leiuperidae) como *P. biligonigerus* (Cope, 1861), *P. gracilis* (Boulenger, 1883) e *P. fuscomaculatus* (Steindachner, 1864).

PALAVRAS-CHAVE. Anura, *Eupemphix nattereri*, ultra-estrutura, espermio gênese, espermatozoide.

Os espermatozoides dos anfíbios são geralmente células alongadas e especialmente modificadas para nadar. A morfologia básica dos espermatozoides dos anfíbios consiste de: cabeça (contendo capa acrossomal e núcleo) e cauda com peça intermediária e principal (DUELLMAN & TRUEB, 1994). A formação desses gametas envolve um extenso e complexo processo que se inicia com a proliferação e diferenciação das espermatogônias, passa pela meiose e termina com a espermio gênese (RASTOGI *et al.*, 1988). Este último evento envolve alterações morfológicas e bioquímicas que transformam espermátides em espermatozoides (PHILIPS, 1974).

A gametogênese e a morfologia do espermatozoide de alguns anuros têm sido estudadas em condições particulares de fertilização, por meio de observações baseadas na morfologia e motilidade *in vitro* (WAGGENER & CARROL, 1998). A grande variação morfológica e morfológica na estrutura do acrossomo, perflatorium e filamento caudal tem contribuído também para a caracterização taxonômica e filogenética (FOUQUETTE & DELAHOSSAYE, 1977; GARRIDO *et al.*, 1989; LEE & JAMIESON, 1992, 1993; JAMIESON *et al.*, 1993; KWON & LEE,

1995; MEYER *et al.*, 1997; JAMIESON & SCHELTINGA, 1997; SCHELTINGA *et al.*, 2002).

Aspectos morfológicos e funcionais da espermio gênese têm sido descritos em vários estudos com anuros, especialmente no que concerne aos complexos eventos envolvendo formação do acrossomo (SPRANDO & RUSSELL, 1988; RASTOGI *et al.*, 1988), compactação cromatínica, alongamento nuclear (REED & STANLEY, 1972; CAVICCHIA & MOVIGLIA, 1983; BÁO *et al.*, 1991; LEE & JAMIESON, 1992, 1993; LEE & KWON, 1992; TABOGA & DOLDER, 1998) e formação do flagelo (TABOGA & DOLDER, 1993).

São poucos os trabalhos baseados em questões da biologia reprodutiva para os gêneros que compõem a família Leiuperidae como as contribuições para algumas espécies do gênero *Physalaemus* (Fitzinger, 1826) (RYAN *et al.*, 1983; RYAN, 1990; BARRETO & ANDRADE, 1995; WOGEL *et al.*, 2002) e do gênero *Eupemphix* (Steindachner, 1863) (OLIVEIRA & ZIERI, 2005). Alguns destes estudos se referem aos aspectos morfológicos do aparelho reprodutor masculino de *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) (OLIVEIRA *et al.*, 2002, 2003b) e à caracterização

estrutural de espermatozoides de *P. biligonigerus* (Cope, 1861), *P. fuscomaculatus* (Steindachner, 1864) e *P. centralis* (Bokermann, 1962) (AMARAL *et al.*, 1999). Este trabalho descreve modificações ultra-estruturais que ocorrem durante a espermiogênese bem como a ultra-estrutura do espermatozoide do anuro *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863) visando contribuir com dados morfológicos que possibilitem estudos comparativos entre espécies dessa família, bem como para a ampliação do conhecimento da biologia reprodutiva de anuros neotropicais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dez machos adultos de *Eupemphix nattereri*, coletados em lagoas temporárias (21°04'40"S; 49°32'23"W) na cidade de Nova Itapirema, distrito de Nova Aliança, Estado de São Paulo, Brasil. As coletas foram realizadas no início da estação chuvosa entre os meses de setembro e outubro de 2003. Os espécimes foram fixados e incorporados à coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia e Botânica do IBILCE, UNESP-SJRP (Lote 640-D; numerados de 8380 a 8389).

Os espécimes foram anestesiados com éter etílico e tiveram suas gônadas removidas após incisão mediana ventral. Para as observações na microscopia eletrônica, as amostras foram fixadas por 2h a 25°C em solução de glutaraldeído 3% e ácido tânico 0,25% em tampão Millonig (pH 7,3 e 0,2M), e lavados posteriormente no mesmo tampão. Os fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora, lavados brevemente em solução tamponada, desidratados em acetona e incluídos em araldite (COTTA-PEREIRA *et al.*, 1976).

Secções ultrafinas foram contrastadas pelo acetato de uranila a 2%, durante 20 minutos (WATSON, 1958) e pelo citrato de chumbo a 2% em solução 1N de hidróxido de sódio (VENABLE & COGGESHALL, 1965), durante 8 minutos, e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão.

RESULTADOS

No início da diferenciação as espermátides apresentam o núcleo arredondado, bastante pronunciado e a cromatina com aspecto frouxo. No citoplasma identificam-se organelas como mitocôndrias, complexo de Golgi, centríolos e retículo endoplasmático liso (Fig. 1). No transcorrer da fase inicial, vesículas originadas pelo complexo de Golgi se fundem formando o acrossomo (Fig. 2) e o centríolo distal origina o filamento caudal (Figs. 3 e 4).

Os estádios intermediários são caracterizados pela compactação da cromatina e alongamento nuclear, e no citoplasma estão presentes retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e fragmentos do envoltório nuclear denominados lamelas aneladas (Fig. 5), além de material

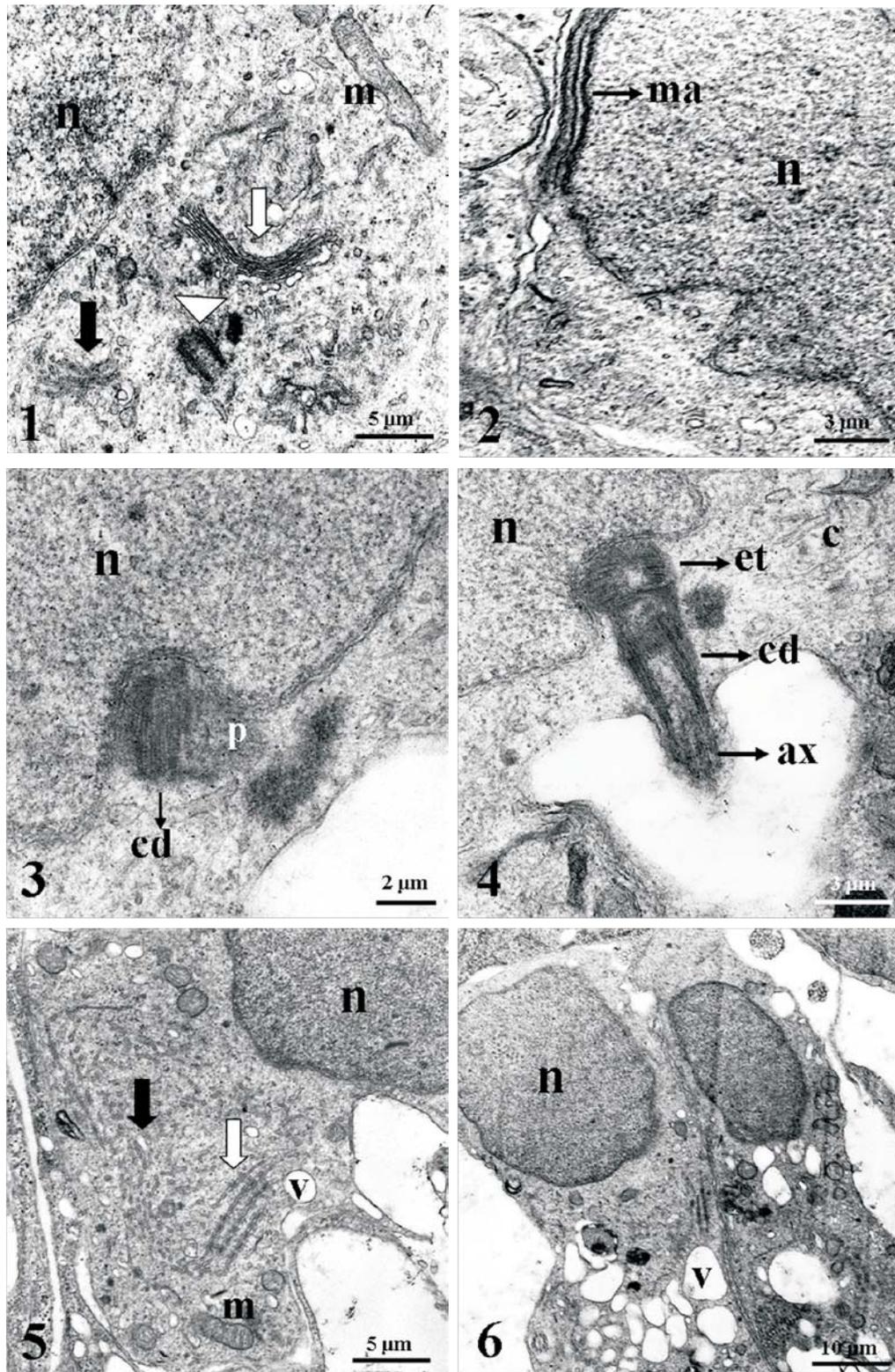
vacuolizado sob a forma de vesículas (Figs. 6 e 7). No citoplasma da célula de Sertoli, envolvendo cada espermátide, pode-se observar grande quantidade de microtúbulos de arranjo helicoidal e paralelos ao sentido do alongamento nuclear, bem como uma grande quantidade de grânulos de glicogênio (Figs. 8 e 9). Concomitantemente ao alongamento do núcleo, o citoplasma das espermátides se deslocam e se desprendem, reduzindo assim o material citoplasmático da região nuclear (Figs. 5-7). A cromatina apresenta-se com pequenos grumos uniformemente distribuídos (Figs. 7-9), até atingir um alto grau de compactação, verificado pela conspícua eletrodensidade nuclear e quase ausência de material citoplasmático (Fig. 10).

Em estágio já avançado da citodiferenciação, as espermátides tardias que anteriormente estavam envolvidas inteiramente pelo citoplasma da célula de Sertoli formando agrupamentos de células ou cistos espermatogênicos, estão agora organizadas em feixes paralelos, com apenas a porção anterior mergulhada e fixa no citoplasma da célula de Sertoli. A célula de Sertoli apresenta núcleo bem evidente com a cromatina finamente distribuída, ao redor dos quais se distribuem várias mitocôndrias (Fig. 11).

As espermátides tardias e os espermatozoides apresentam três partes principais distintas: cabeça, peça intermediária e cauda. Revestindo a porção anterior do núcleo, como uma capa, está a vesícula acrossômica alongada e cônica; logo abaixo encontra-se o perflatorium, estrutura cônica, alongada, fibrilar e eletrodensa; e anteriormente ao núcleo identifica-se o espaço subacrossomal. Estas três estruturas formam o complexo acrossômico (Fig. 12). O núcleo, bastante compacto e alongado possui cromatina condensada, e em sua região posterior, uma pequena quantidade de material citoplasmático contendo mitocôndrias (Fig. 13).

A peça intermediária apresenta dois centríolos perpendiculares embebidos no material pericentriolar, o centríolo proximal, localizado mais próximo ao núcleo (Fig. 13), e o centríolo distal, responsável pelo desenvolvimento do flagelo. A estrutura flagelar pode ser ultra-estruturalmente subdividida em três regiões: estrias transversais, centríolo distal e axonema (Fig. 4). Uma bainha citoplasmática, contendo mitocôndrias e lamelas aneladas, envolve o axonema e a fibra justaxonemal na porção inicial do flagelo, ainda na peça intermediária (Fig. 14), e se torna delgada (Fig. 15) até desaparecer completamente.

A cauda consiste de um axonema, constituído pelo arranjo convencional de microtúbulos (9+2), uma fibra justaxonemal e na região mediana da cauda também se encontra uma extensa membrana ondulante (Fig. 16). O axonema e a fibra justaxonemal são rodeados por uma membrana citoplasmática comum e à medida que vão se aproximando da região terminal da cauda ocorre uma redução da fibra justaxonemal e ausência da membrana ondulante (Fig. 17).



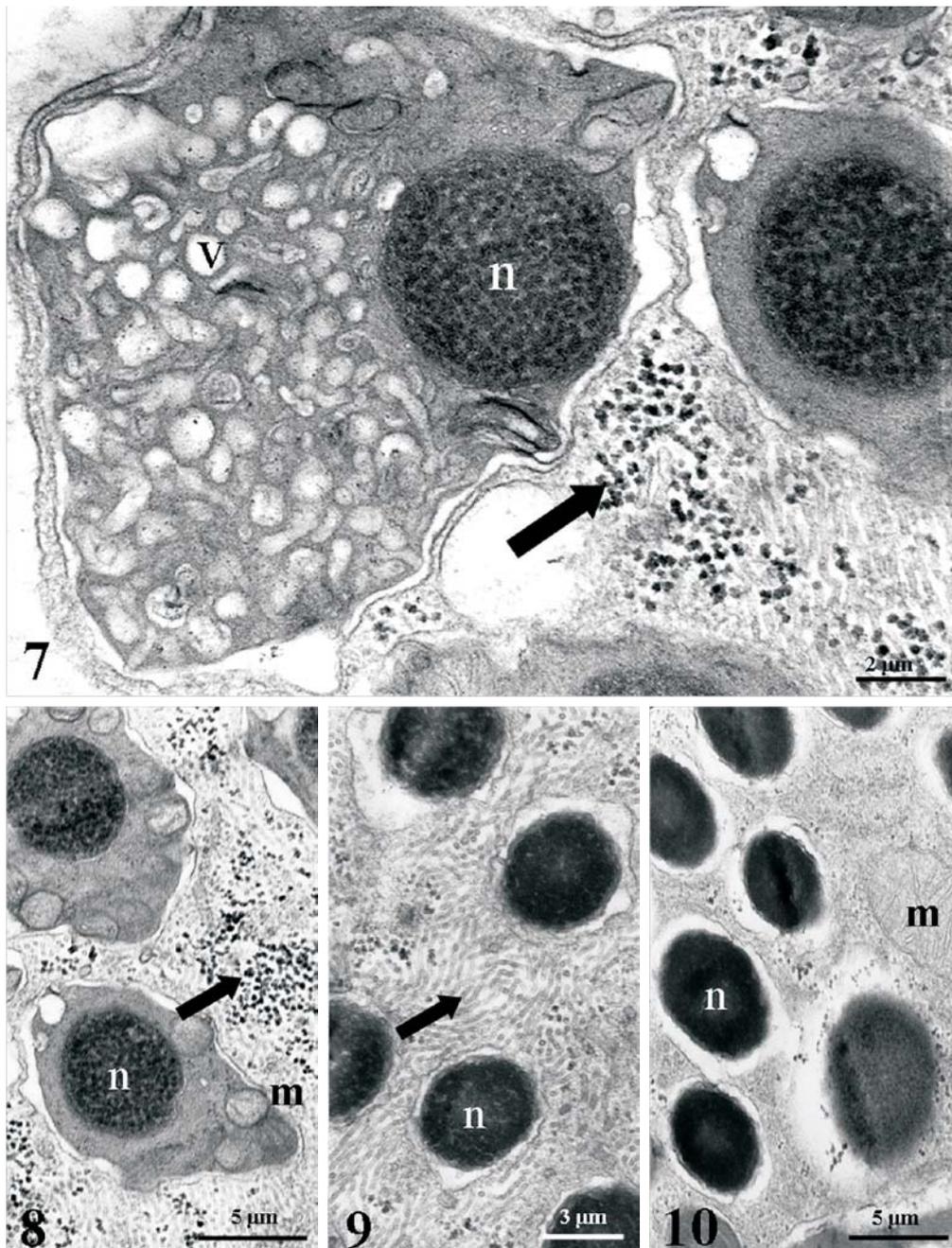
Figs. 1-6. Espermiogênese em *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863). 1, Espermátide inicial com um desenvolvido complexo de Golgi (seta clara), que dará origem à membrana acrossômica, um dos centríolos do par (cabeça de seta), mitocôndria (m), retículo endoplasmático liso (seta escura) e núcleo com a cromatina dispersa (n); 2, Corte sagital em espermátide inicial mostrando a membrana acrossômica (ma) associada à porção anterior do núcleo (n); 3, Secção longitudinal de espermátide em fase inicial do desenvolvimento do flagelo, mostrando o núcleo (n) com a cromatina dispersa, o centríolo distal (cd) situado na fossa nuclear e a presença de material pericentriolar (p); 4, Secção longitudinal de espermátide, evidenciando a orientação perpendicular do centríolo distal com a membrana plasmática, a presença de microtúbulos no axonema em formação na futura região da peça intermediária. Axonema (ax), centríolo distal (cd), citoplasma (c), estriações transversais (et) e núcleo (n); 5-6, Espemátides com núcleo (n) ovóide e resíduo citoplasmático volumoso contendo mitocôndrias (m), lamelas aneladas (seta clara), retículo endoplasmático liso (seta escura) e vesículas (v) eliminando porções citoplasmáticas.

DISCUSSÃO

O processo espermatogênético em *E. nattereri* ocorre em estruturas denominadas lóculos seminíferos, nos quais o epitélio germinativo é organizado em espermatocistos, de maneira similar ao descrito para outros anuros (HERMOSILLA *et al.*, 1983; RASTOGI *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003a,b). Na medida em que se formam as espermátides alongadas, o arranjo cístico se desfaz e então estas células se agrupam

em feixes compactos (SPRANDO & RUSSEL, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 2003a).

Como verificado por OLIVEIRA *et al.* (2003a) em *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925) e por TABOGA & DOLDER (1991) em *Scinax ranki* (= *Hyla ranki*) (Andrade & Cardoso, 1987), as espermátides de *E. nattereri* também sofrem um processo de diferenciação que envolve várias alterações núcleo-citoplasmáticas: alongamento nuclear, condensação do material cromatínico, formação do acrossomo, desenvolvimento da cauda e perda do material citoplasmático.

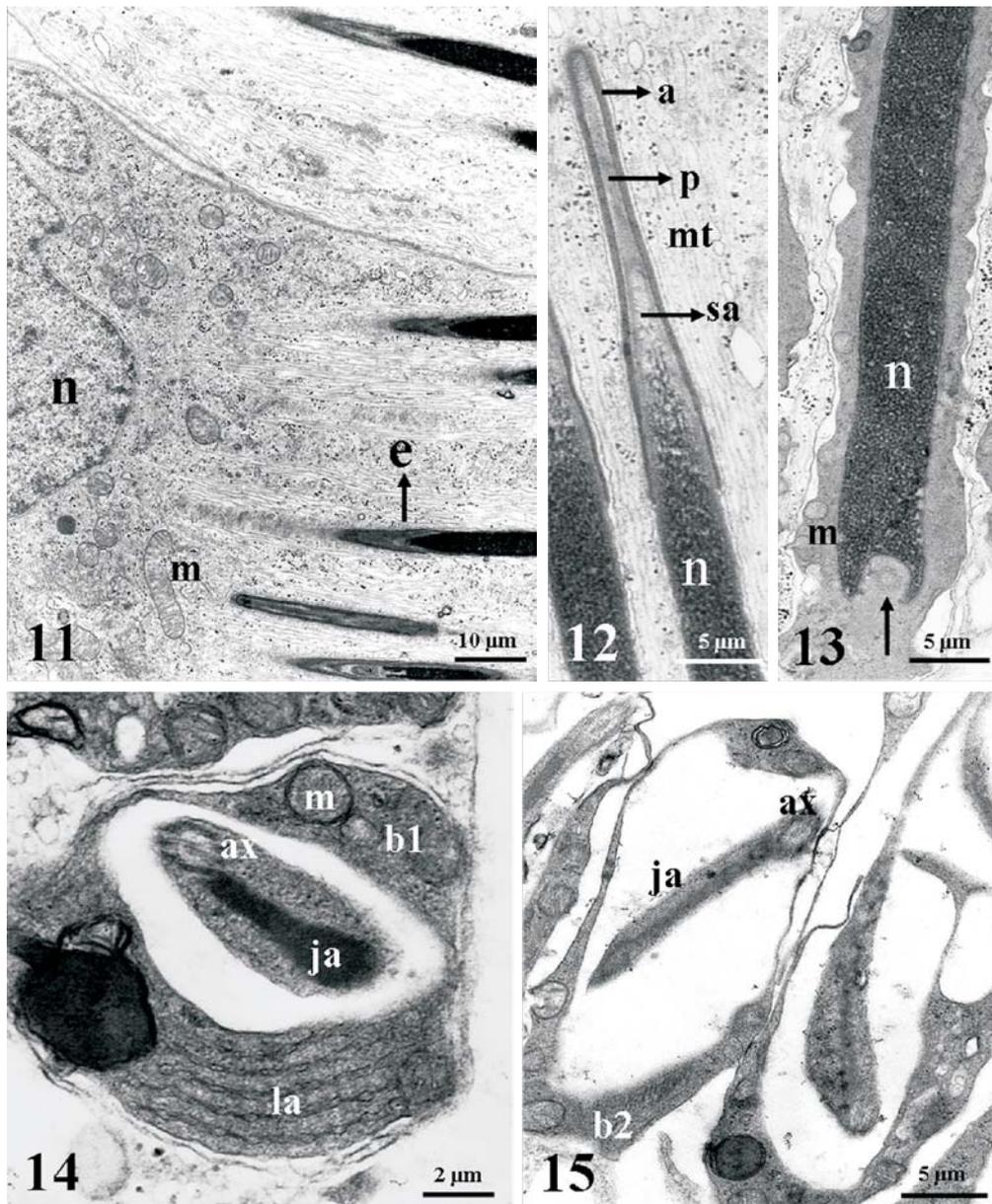


Figs. 7-10. Espermiogênese em *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863). 7-8, Espermátides em secção transversal com o padrão de compactação da cromatina em grumos densos (n), citoplasma com grande quantidade de mitocôndrias (m) e de vesículas citoplasmáticas (v) contendo material a ser eliminado. O citoplasma da célula de Sertoli está repleto de grânulos de glicogênio (seta); 9, Espermátides em secção transversal mostrando o núcleo (n) e citoplasma da célula de Sertoli repleto de microtúbulos (seta); 10, Célula de Sertoli contendo mitocôndria (m), secção transversal com adiantado grau de compactação nuclear (n).

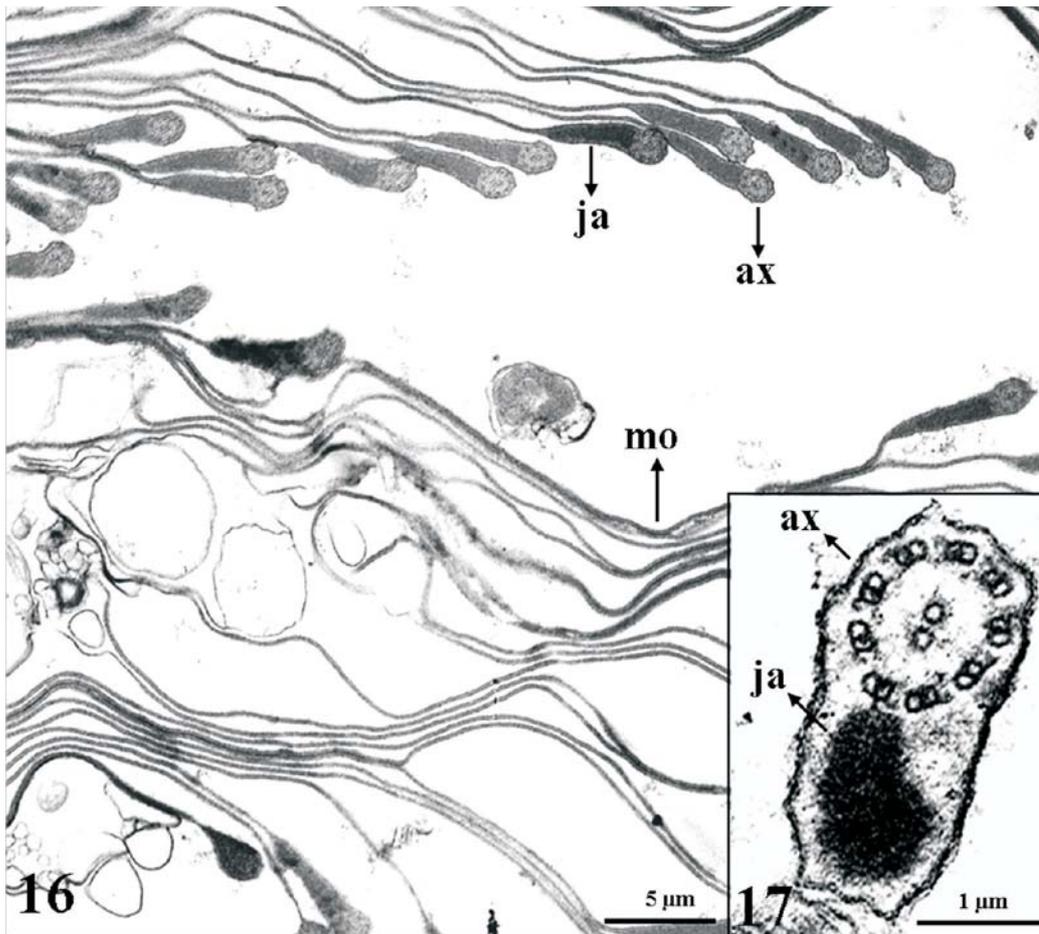
O núcleo das espermátides de *E. nattereri* sofre gradual condensação e aumento de eletrodensidade, como descrito para *Megophrys montana* (Kuhl & Hasselt, 1822) (ASA & PHILLIPS, 1988) e para *P. biligonigerus*, *P. fuscomaculatus* e *P. gracilis* (Boulenger, 1883) (AMARAL *et al.*, 1999). O processo de alongamento celular é auxiliado por uma grande quantidade de microtúbulos no citoplasma da célula de Sertoli que entremeia as espermátides e uma menor quantidade na região perinucleolar (RASTOGI *et al.*, 1988; BÃO *et al.*, 1991; AMARAL *et al.*, 1999).

Além dos microtúbulos que atuam no alongamento das espermátides, também se observa no citoplasma da célula de Sertoli de *E. nattereri* uma grande quantidade de grânulos de glicogênio, como observado em *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) (SPRANDO & RUSSEL, 1988) e *Pachymedusa dactinicolor* (Cope, 1864) (RASTOGI *et al.*, 1988).

Outra característica das espermátides de *E. nattereri* é a grande redução do volume citoplasmático, através da perda de prolongamentos sob a forma de vesículas, que serão fusionadas e reabsorvidas pelas



Figs. 11-15. Espermiogênese em *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863). 11, Secção longitudinal em feixe de espermátides tardias (e) no interior da célula de Sertoli. A célula de Sertoli apresenta núcleo (n) com cromatina frouxa e no citoplasma observa-se mitocôndrias (m), inúmeros microtúbulos e grânulos de glicogênio ao redor das espermátides; 12, Secção longitudinal de espermátide tardia entremeada pelo citoplasma da célula de Sertoli. Acrossomo (a), perforatorium (p), espaço subacrossomal (sa), núcleo (n) e microtúbulos (mt) rodeando a espermátide; 13, Secção longitudinal de espermátide tardia. Núcleo (n), mitocôndria (m) e centríolo proximal (seta); 14-15, Secção transversal em diferentes alturas na região proximal da cauda, envolta pela bainha citoplasmática. Quanto mais próxima da peça intermediária, a bainha é mais espessa (b1), contendo mitocôndria (m) e lamelas aneladas (la). A medida que se distancia desta porção, a bainha (b2) torna-se mais delgada. O filamento caudal está representado pelo axonema (ax) e pela fibra justaxonemal (ja).



Figs. 16-17. Espermiogênese em *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863). 16, Secção transversal da porção mediana da cauda. Axonema (ax), fibra justaxonemal (ja) e membrana ondulante (mo); 17, Secção transversal da porção final da cauda. Axonema (ax) e fibra justaxonemal (ja).

células de Sertoli como em *H. ranki* (TABOGA & DOLDER, 1998) ou degradadas no epitélio do ducto de Wolff como em *R. catesbeiana* (SPRANDO & RUSSEL, 1988).

Nas etapas finais da espermiogênese, o acrossoomo apresenta uma capa de forma cônica na região anterior do núcleo como em outros anfíbios (NICANDER, 1970; RASTOGI *et al.*, 1988; BÃO *et al.*, 1991; AMARAL *et al.*, 1999) e o perforatorium localizado entre o acrossoomo e o núcleo. Esta estrutura contém filamentos de actina e desempenha papel importante durante a penetração no óvulo (BACCETI *et al.*, 1980).

Entre os vertebrados, os anfíbios apresentam uma enorme diversidade em suas estratégias reprodutivas e locais de fertilização (DUELLMAN & TRUEB, 1994), isso reflete em uma grande diferenciação e variabilidade no filamento caudal, tendo em vista os anexos protéicos e peças membranosas que esta região pode apresentar em gametas de diferentes anfíbios já estudados (TABOGA & DOLDER, 1993). Em *E. nattereri*, além de mitocôndrias localizadas e comumente descritas na bainha citoplasmática, uma peculiaridade em espermátides tardias é a persistência de lamelas aneladas na bainha citoplasmática.

O filamento caudal apresenta um axonema típico (9+2) sem nenhum anexo caudal em *R. pipiens* (Screber,

1782) e *R. clamitans* (Latreille, 1801) (POIRIER & SPINK, 1971) e alguns Microhilídeos (SCHELTINGA *et al.*, 2002), ou com dois axonemas em *Megophrys montana* (Kuhl & van Hasselt, 1822) (ASA & PHILLIPS, 1988) e *Lepidobatrachus laevis* (Budgett, 1899) (WAGGENER & CARROL JR., 1998). O filamento caudal com axonema, membrana ondulante e bastão axial está presente em *Pachymedusa dactylicolor* (RASTOGI *et al.*, 1988) e *Bufo gargarizans* Cantor, 1842 (KWON & LEE, 1995). A cauda de *Hyla japonica* (Günther, 1859) consiste de um axonema e um bastão axial, mas não possui uma membrana ondulante (KWON & LEE, 1995). O anuro *E. nattereri* possui o filamento caudal constituído por axonema, membrana ondulante, fibra justaxonemal e ausência do bastão axial, semelhante ao descrito por AMARAL *et al.* (1999) para três espécies de *Physalaemus*.

A descrição do gameta de *E. nattereri* confere características morfológicas que reforçam a proximidade filogenética com outras espécies da família Leiuperidae.

Agradecimentos. A FAPESP pelo auxílio à pesquisa (processos n.º. 2002/08016-9 e 2005/02919-5). A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado para Rodrigo Zieri.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, M. J. L. V.; FERNANDES, A. P.; BÃO, S. N. & RECCO-PIMENTEL, S. M. 1999. An ultrastructural study of spermiogenesis in three species of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). **Biocell** 23(3):211-221.
- ASA, C. S. & PHILLIPS, D. M. 1988. Nuclear shaping in spermatids of the Thai leaf frog *Megophrys montana*. **Anatomical Record** 220(3):287-290.
- BACCETTI, B.; BIGLIARDI, E. & BURRINI, A. G. 1980. The morphogenesis of the vertebrate perforatorim. **Journal of Ultrastructure Research** 71:272-287.
- BÃO, S. N.; DALTON, G. C. & OLIVEIRA, S. F. 1991. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA. **Journal of Morphology** 207(3):303-314.
- BARRETO, L. & ANDRADE, G. V. 1995. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia** 16:67-76.
- CAVICCHIA, J. C. & MOVIGLIA, G. A. 1983. The blood-testis barrier in the toad (*Bufo arenarum*, Hensel): a freeze-fracture and lanthanum tracer study. **Anatomical Record** 205(4):387-396.
- COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F. G. & DAVID-FERREIRA, J. F. 1976. Use of tannic acid-glutaraldehyde in study of elastic and elastic-related fibers. **Stain Technology** 51(1):7-11.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. 1994. **Biology of Amphibia**. New York, McGraw-Hill Book Company. 670p.
- FOUQUETTE JR., M. J. & DELAHOSSAYE, A. J. 1977. Sperm morphology in the *Hyla rubra* (Amphibia, Anura, Hylidae), and its bearing on generic status. **Journal of Herpetology** 11(4):387-396.
- GARRIDO, O.; PUGIN, E. & JORQUERA, B. 1989. Sperm morphology of *Batrachyla* (Anura: Leptodactylidae). **Amphibia-Reptilia** 10:141-149.
- HERMOSILLA, I. B.; URBINA, A. P. & CABRERA, J. C. P. 1983. Espermatogênese en la rana Chilena *Caudiverbera caudiverbera* (Linneú, 1758) (Anura, Leptodactylidae). **Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción** 54:103-115.
- JAMIESON, B. G. M. & SCHELTINGA, D. M. 1997. Sperm ultrastructure of six Australian hylid frogs from two genera (*Litoria* and *Cyclorana*): phylogenetic implications. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology** 29(4):443-451.
- JAMIESON, B. G. M.; LEE, M. S. Y. & LONG, K. 1993. Ultrastructure of the spermatozoon of the internally fertilizing frog *Ascaphus truei* (Ascaphidae: Anura: Amphibia) with phylogenetic applications. **Herpetologica** 49:52-65.
- KWON, A. S. & LEE, Y. H. 1995. Comparative spermatology of anurans with special references to phylogeny. In: *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. **Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle** 166:321-332.
- LEE, M. S. Y. & JAMIESON, B. G. M. 1992. The ultrastructure of the spermatozoa of three species of Myobatrachid frogs (Anura, Amphibia) with phylogenetic considerations. **Acta Zoologica** 73:213-222.
- _____. 1993. The ultrastructure of the spermatozoa of bufonid and hylid frogs (Anura, Amphibia): implications for phylogeny and fertilization biology. **Zoologica Scripta** 22(3):309-323.
- LEE, M. S. Y. & KWON, A. S. 1992. Ultrastructure of spermiogenesis in *Hyla japonica* (Anura, Amphibia). **Acta Zoologica** 73:49-55.
- MEYER, E.; JAMIESON, B. G. M. & SCHELTINGA, D. M. 1997. Sperm ultrastructure of six Australian hylid frogs from two genera (*Litoria* and *Cyclorana*) phylogenetic implications. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology** 29:433-451.
- NICANDER, L. 1970. **Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa**. In: BACCETTI, B. ed. **Comparative Spermatology**. New York, Academic. p.47-62.
- OLIVEIRA, C. & ZIERI, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia** 22(2):454-460.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C. A. & TABOGA, S. R. 2003a. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). **Caryologia** 56(1):75-83.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C. & ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomia** 20(3):263-268.
- OLIVEIRA, C.; SANT'ANNA, A. C.; OMENA, P. M.; SANTOS, L. R. S. & ZIERI, R. 2003b. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências** 11(1):39-46.
- PHILLIPS, D. M. 1974. **Spermiogenesis**. New York & London, Academic. p.1-68.
- POIRIER, G. R. & SPINK, G. E. 1971. Ultrastructure of testicular spermatozoa in two species of *Rana*. **Journal of Ultrastructure Research** 36:455-465.
- RASTOGI, R. K.; BAGNARA, J. T.; IELA, L. & KRASOVICH M. A. 1988. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. **Journal of Morphology** 197(3):277-302.
- REED, S. C. & STANLEY, H. P. 1972. Fine structure of spermatogenesis in the South African clawed toad *Xenopus laevis* Daudin. **Journal of Ultrastructure Research** 41:277-295.
- RYAN, M. J. 1990. Vocal morphology of the *Physalaemus pustulosus* species group (Leptodactylidae): morphological response to sexual selection for complex calls. **Biological Journal of the Linnean Society** 40:37-52.
- RYAN, M. J.; BARTHOLOMEU, G. A. & RAND, A. S. 1983. Energetics of reproduction in a Neotropical frog, *Physalaemus pustulosus*. **Ecology** 64(6):1457-1462.
- SCHELTINGA, D. M.; JAMIESON, B. G. M.; BICKFORD, D. P.; GARDA, A. A.; BÃO, S. N. & MCDONALD, K. R. 2002. Morphology of the spermatozoa of the Microhylidae (Anura, Amphibia). **Acta Zoologica** 83:263-275.
- SPRANDO, R. L. & RUSSEL, L. D. 1988. Spermiogenesis in the bull frog (*Rana catesbeiana*): a study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. **Journal of Morphology** 198:303-319.
- TABOGA, S. R. & DOLDER, A. M. H. 1991. Análise histológica da espermatogênese de *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas** 2:66-71.
- _____. 1993. Ultrastructural analysis of the *Hyla ranki* spermatozoan tail (Amphibia, Anura, Hylidae). **Cytobios** 75:85-92.
- _____. 1998. Spermiogenesis of *Scinax ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae): nuclear compaction and associated cytoplasmic events. **Brazilian Journal of Morphological Science** 15:157-163.
- VENABLE, J. H. & COGGESHALL, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 25:407-408.
- WAGGENER, W. L. & CARROL JR., E. J. 1998. Spermatozoon structure and motility in the anuran *Lepidobatrachus laevis*. **Development, Growth and Differentiation** 40:27-34.
- WATSON, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology** 4:475-478.
- WOGEL, H.; ABRUNHOSA, P. A. & POMBAL JR., J. P. 2002. Atividade reprodutiva de *Physalaemus signifer* (Anura, Leptodactylidae) em ambiente temporário. **Iheringia, Série Zoologia**, 92(2):57-70.