



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Ciclo reprodutivo e análise ultraestrutural da espermatogênese de *Cichla kelberi* (Teleostei: Perciformes: Cichlidae)

Diógenes Henrique de Siqueira Silva

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

- 2011 -

Diógenes Henrique de Siqueira Silva

Ciclo reprodutivo e análise ultraestrutural da espermatogênese de *Cichla kelberi* (TELEOSTEI: PERCIFORMES: CICHLIDAE)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Carlos Alberto Vicentini

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosicleire Veríssimo Silveira

São José do Rio Preto
2011

Siqueira-Silva, Diógenes Henrique de.

Ciclo reprodutivo e análise ultraestrutural da espermatogênese de *Cichla kelberi* (Teleostei: Perciformes: Cichlidae) / Diógenes Henrique de Siqueira-Silva. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

84 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Carlos Alberto Vicentini

Co-orientador: Rosicleire Veríssimo Silveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia animal. 2. Espermatogênese em animais. 3. Peixes – Reprodução. 4. Cicldeos. I. Vicentini, Carlos Alberto. II. Veríssimo-Silveira, Rosicleire. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 597.5

Diógenes Henrique de Siqueira Silva

Ciclo reprodutivo e análise ultraestrutural da espermatogênese de *Cichla kelberi* (TELEOSTEI: PERCIFORMES: CICHLIDAE)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Drº. Carlos Alberto Vicentini
Professor Titular
UNESP - Bauru
Orientador

Profº. Drº. Classius de Oliveira
Professor Assistente Doutor
UNESP - São José do Rio Preto

Profº. Drº. Sérgio Ricardo Batlouni
Pesquisador
UNESP - Jaboticabal

São José do Rio Preto 25 de fevereiro de 2011

DEDICO

Ao meu pai Antonio Olívio (*In memoriam*),

que trabalhando dobrado,

sacrificou seus sonhos

em favor dos que tinha como meus.

Obrigado por sua dedicação, apoio e incentivo.

Agradecimentos

A Deus, por compreender meus anseios e me encorajar a atingir meus objetivos.

Ao meu orientador profº. Drº. Carlos Alberto Vicentini, com grande admiração e respeito, pela oportunidade e confiança em mim depositada e sua orientação.

À minha co-orientadora profa. Dra. Rosicleire Veríssimo Silveira, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação, além de sua indispensável amizade e orientação;

À FAPESP pela concessão de bolsa de estudos sob o número 2009/02891-4;

Ao profº. Drº Alexandre Ninhaus Silveira, por compartilhar humildemente seus conhecimentos, que sem dúvida foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À profa. Dra. Maria Tercília pelas sugestões e ensinamentos durante o exame de qualificação.

À profa. Dra. Marineide Rosa Vieira, com admiração, pelos precisos conselhos e amizade.

Aos professores Drº. Classius de Oliveira e Drº. Sérgio Ricardo Batlouni pelo aprendizado e sugestões para melhoria do trabalho durante a defesa de minha dissertação de mestrado.

À coordenação do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal do IBILCE – UNESP, pela confiança e oportunidade de formação profissional.

À Meiri, Cleusa e Zeneide, secretárias do Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, pela amizade, pelas muitas risadas e grande auxílio no decorrer do trabalho.

À Sílvia Emiko Kazama e Sílvia Mara Vicentini, funcionárias da seção técnica de pós-graduação do IBILCE, UNESP, por seu auxílio no decorrer do trabalho.

Ao técnico Sidval do Laboratório de Bromatologia do Depto. de Biologia e Zootecnia da FE, UNESP, pela amizade e colaboração no decorrer do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.NEO), FE, UNESP, Ilha Solteira, Isângela, Amanda, Raphael, Giovana, Felipe, Cristiane, Mirian, Matheus, Aline e Laiza pela convivência, amizade, auxílio nas coletas e churrascos.

Aos amigos da Republica JANELAS de S. J. do Rio Preto por todos os momentos de alegria, amizade e companheirismo;

Agradecimentos especiais

Aos meus pais Maria Sônia e Antônio Olívio (In memoriam) que com amor e dedicação não foram apenas pais, mas amigos e companheiros mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis.

Ao meu irmão Diemison que, mesmo involuntariamente, me motiva a continuar lutando por meus ideais.

À família de Maria Lima dos Santos (D. Nega) e José Pereira dos Santos (Seu Zé), que me estenderam a mão nos momentos mais difíceis e compartilharam comigo os prazeres e dificuldades desta jornada.

À minha namorada Amanda, pelo amor, carinho e paciência.

À minha amiga Isa, que há sete anos me SUPORTA, compartilhando meus tropeços e vitórias .

Enfim, a todos, que de uma maneira, ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho e torceram pelo meu sucesso.

“Pedras no caminho?

Guardo todas,
um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

“A nossa maior glória

não reside no fato de nunca
cairmos,

mas sim em levantarmo-nos sempre
depois de cada queda.”

Confúcio

RESUMO

O *Cichla kelberi*, espécie recentemente classificada e popularmente conhecida como tucunaré amarelo, é endêmico dos rios Araguaia e baixo Tocantins, sendo, entretanto, encontrado em muitas outras bacias, onde apresenta grande importância para a pesca profissional por seu alto valor econômico, devido a qualidade e sabor de sua carne, e pela pesca esportiva, como pode ser observado pelos campeonatos anuais de pesca ao tucunaré nos rios em que se encontra. Para entender esse rápido processo de ocupação e adaptação a novos ambientes, 78 exemplares de *Cichla kelberi* foram mensalmente coletados entre os meses de março de 2009 a fevereiro de 2010, com o auxílio de vara de pesca e anzol na Lagoa do Pernilongo (20° 29' 11,93"S, 51° 25' 33,27"O) e Ilha da Ferradura (20° 28' 27,11" S, 51° 25' 54,53"O), no Reservatório de Jupiá, rio Paraná, Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, onde foi introduzido. Foram definidas quatro classes de maturação gonadal para o ciclo reprodutivo anual do tucunaré amarelo *C. kelberi*. A definição das classes de Maturação Inicial, Maturação Intermediária, Maturação Final e Regressão, tiveram como base as alterações do epitélio germinativo testicular associado aos estágios das células germinativas presentes. A Classe de Maturação Inicial é caracterizada pela presença de um epitélio germinativo totalmente contínuo, cistos com células germinativas em todos os estágios de desenvolvimento, intensa atividade espermatogênica por todo o testículo e raros "clusters" periféricos, formados por espermatogônias primárias. A Classe de Maturação Intermediária inicia com o surgimento de um epitélio germinativo descontínuo na região anastomosada, com diminuição da espermatogênese e estocagem de espermatozóides nesta região. Os agrupamentos periféricos de espermatogônias ou "clusters" estão ausentes ao final desta classe de maturação. Na Classe de Maturação Final a descontinuidade do epitélio germinativo atinge a região periférica dos lóbulos. Apesar do ducto testicular principal e região anastomosada atuarem na estocagem de espermatozóides, a espermatogênese não cessa na periferia testicular. Os "clusters" periféricos são novamente observados ao final desta classe reprodutiva. A Classe de Regressão caracteriza-se pela presença de um epitélio germinativo totalmente descontínuo em todos os lóbulos; número reduzido de

espermatozoides, com alguns ainda em espermatogênese; espermatozoides residuais dispersos por toda a extensão gonadal; espermatogônias primárias iniciando sua proliferação e um elevado número de “clusters” espermatogoniais periféricos.

As características ultraestruturais das células germinativas em *C. kelberi*, assemelham-se ao padrão apresentado pela maioria dos Teleósteos. A espermatogênese é do tipo cística, resultando na formação de um espermatozoide aquático Tipo I. A análise da espermatogênese permitiu a identificação de dois tipos de células germinativas: as mitóticas, e as meióticas. No primeiro tipo, estão representadas as espermatogônias primárias e secundárias, caracterizadas pela presença de corpos cromatóides. Já as células meióticas incluem, os espermatócitos primários, identificados pela compactação cromatínica e presença de complexos sinaptonêmicos e, espermatócitos secundários, menos volumosos e raramente observados. A espermiogênese mostra que as espermátides caracterizam-se, por uma compactação cromatínica gradual na forma de filamentos justapostos; desenvolvimento flagelar; formação da fossa nuclear, rotação do núcleo e; eliminação do excesso de citoplasma. Os espermatozoides são formados por cabeça, peça intermediária e flagelo. A cabeça é esférica, não apresenta acrossoma e está envolvida por uma estreita faixa de citoplasma. A fossa nuclear apresenta uma projeção que adentra no núcleo. A peça intermediária é curta, apresenta expansões citoplasmáticas e, abriga aproximadamente 10 mitocôndrias. O flagelo possui eixo perpendicular e ligeiramente excêntrico à base do núcleo, apresentando o clássico axonema 9+2. Possui duas expansões laterais da membrana flagelar que apresentam tamanhos variáveis. A reprodução em *C. kelberi* é do tipo parcelada, e assim como a maioria dos teleósteos, apresenta o tipo básico de espermatozoide, conhecido como “aquasperma” uniflagelado anacrossomal.

Palavras-chave: Classes reprodutivas. epitélio germinativo. espermiogênese. espermatozoide. maturação gonadal. tucunaré.

ABSTRACT

The *Cichla kelberi*, a recently classified specie and popularly known as yellow peacock bass, is endemic from the Araguaia an low Tocantins river, being, however, found in many other basins, where has great importance for the professional fishing for its high economic value due to the quality and flavor of their meat and fishing, as can be observed by annual championships of peacock in the rivers where it is. To understand this fast process of occupation and adaptation to new environments, 78 specimens of *C. kelberi* were caught monthly between the months of March 2009 to February 2010 with the aid of fishing pole and hook, from the Lagoa do Pernilongo (20° 29' 11,93"S, 51° 25' 33,27"O) and Ilha da Ferradura (20° 28' 27,11" S, 51° 25' 54,53"O), in the Jupiá Reservoir, Parana River, Ilha Solteira, São Paulo, Brazil, where it was introduced. It was defined four gonadal maturation class to the annual reproductive cycle of the yellow peacock bass *C. kelberi*. The definition of the Early Maturation, Mid Maturation, Final Maturation and Regression Classes, were based on the changes of the testicular germinal epithelium associated with the germ cell stages present. The Class of Early Maturation is characterized by the presence of a fully continuous germinal epithelium, cysts with germ cells at all stages of development, intense spermatogenic activity throughout the testis and rare "clusters" peripherals, consisting of primary spermatogonia. The Mid maturation Class starts with the appearance of a discontinuous germinal epithelium in the anastomosed region with spermatogenesis decrease and sperm storage in this region. The peripheral groups of spermatogonia or "clusters" are missing at the end of this class of maturation. In the Final Maturation Class the germinal epithelium discontinuity reaches the periphery of lobules. Although the testicular main duct and anastomosed region act in storing sperm, spermatogenesis does not cease in the testicular periphery. The peripherals "clusters" are again observed at the end of this reproductive class. The Regression Class is characterized by the presence of a totally discontinuous germinal epithelium in all lobes; few spermatocysts, with some still in spermatogenesis; waste sperm scattered across the length gonadal; primary spermatogonia initiating it proliferation and a large number of spermatogonium peripheral "clusters". The ultrastructural characteristics of germ cells in *C. kelberi*,

resemble the pattern shown by most teleosts. The Spermatogenesis is cystic type, resulting in the formation of a sperm water Type I. The analysis of spermatogenesis allows the identification of two types of germ cells: the mitotic and meiotic ones. In the first type depicts the primary and secondary spermatogonia, characterized by the presence of chromatoid bodies. Already the meiotic cells include, the primary spermatocytes, identified by chromatin condensation and presence of synaptonemal complexes, and secondary spermatocytes, less large and rarely observed. Spermiogenesis shows that the spermatids are characterized by a gradual chromatin condensation in filaments juxtaposed form; flagellar development; formation of the nuclear fossa; nuclear rotation and; elimination of excess cytoplasm. Sperm are formed by head, midpiece and flagellum. The head is spherical, has no acrosome and is surrounded by a narrow strip of cytoplasm. The nuclear fossa shows a projection which enters into the nucleus. The midpiece is short, show cytoplasmatic expansion and comprises about 10 mitochondria. The flagellum has axis perpendicular and slightly eccentric to the base of the nucleus, with the classical 9 +2 axoneme. It has two lateral extensions of the flagellar membrane that have variable lengths. The reproduction in C. kelberi is the multiple spawn type, and like most teleostei show the basic spermatozoon type, known as anacrossomal uniflagellate aquasperm.

Key-words: reproductive Class. germinative epithelium. spermiogenesis. spermatozoon. gonadal maturation. peacock bass.

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO GERAL	01
I.1	MORFOLOGIA TESTICULAR	04
II	OBJETIVOS	09
II.1	OBJETIVOS GERAIS	09
II.2	OBJETOS ESPECÍFICOS	09
III	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
IV	CAPÍTULO 1	
	Ciclo reprodutivo anual do tucunaré amarelo <i>Cichla kelberi</i> (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Jupiá, rio Paraná, São Paulo, Brasil.	20
	Resumo	20
	Abstract	22
	Introdução	23
	Material e métodos	24
	Resultados	28
	Discussão	34
	Figuras	40
	Referências bibliográficas	51
V	CAPÍTULO 2	
	Análise ultraestrutural da espermatogênese do ciclídeo Neotropical <i>Cichla kelberi</i> (TELEOSTEI: PERCIFORMES: CICHLIDAE).	60
	Resumo	60
	Abstract	61

	Introdução	62
	Material e métodos	63
	Resultados	64
	Discussão	67
	Figuras	72
	Referências bibliográficas	77
VI	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84

I. INTRODUÇÃO

Estima-se que os peixes compreendem aproximadamente 33.000 espécies marinhas e de água doce, sendo a ictiofauna de água doce Neotropical, considerada a mais rica do mundo. De acordo com Reis *et al.* (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimada para o planeta, aproximadamente 6.000 espécies são encontradas na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente. Toda esta diversidade representa aproximadamente 20% de todos os peixes existentes e 10% de todas as espécies de vertebrados. Segundo Buckup *et al.* (2007), este elevado número de espécies reflete não apenas a grande diversidade existente nas bacias hidrográficas tropicais e subtropicais da região Neotropical, na qual o Brasil está inserido, como também num constante e significativo aumento do conhecimento sobre a ictiofauna brasileira. Em análise das datas de descrições das espécies de peixes de água doce, ocorrentes no Brasil, Buckup *et al.* (2007) mostra que o número de espécies conhecidas continua a aumentar significativamente, registrando-se crescimento superior a 20% na última década (411 espécies), e que o período de 2001 a 2005 foi o mais produtivo da história da ictiologia brasileira, tendo sido descritas 267 espécies de peixes.

Com aproximadamente 150 famílias a Ordem Perciformes é a mais diversificada dentro do grupo dos peixes, com 9.293 espécies, e a maior ordem dos vertebrados em número de espécies, sendo o grupo dominante em muitos ambientes de água doce tropical e subtropical (OYAKAWA *et al.*, 2006). Dentre as mais importantes famílias desta ordem, a família Cichlidae, conhecida por apresentar a linha lateral seccionada e a maxila superior com capacidade protrátil, tem preferência por ambientes lênticos, sendo considerada a mais numerosa família de peixes não-Ostariophysi e uma das maiores famílias de vertebrados com pelo menos 1.300 espécies conhecidas e uma estimativa de existência de 1.900 espécies, com destaque para a região Neotropical, na qual é considerada a terceira família de peixes mais diversa, atrás apenas das famílias Characidae e Loricariidae, respectivamente (REIS *et al.*, 2003). Nesta região, são encontradas aproximadamente 600 espécies de ciclídeos distribuídos em cerca de 60 gêneros distintos, em diversos rios e canais das Américas do Sul e Central, ocorrendo desde a Patagônia até o Texas. Em meio a toda esta diversidade, 291 espécies válidas são encontradas na América do Sul, das quais 220 estão presentes no Brasil (FARIAS *et al.* 2000; REIS *et al.* 2003; SPARKS & SMITH, 2004; OYAKAWA *et al.*, 2006; RICAN & KULLANDER, 2006; BUCKUP *et al.*, 2007). Esta grande diversidade dos ciclídeos é

atribuída a dois fatores principais: seu avançado cuidado parental e o desenho de seu complexo maxilar faringeano utilizado para mastigação da comida, possibilitando aos membros desta família adaptação a ambientes distintos e, conseqüentemente, uma grande dispersão geográfica. (REIS *et al.*, 2003).

Entre os ciclídeos mais populares, estão as espécies do gênero *Cichla*, que são consideradas os maiores representantes da família, sendo localmente conhecidas como tucunaré (Brasil e Peru), pavón (Venezuela e Colômbia) ou peacock bass (América do Norte) (WINEMILLER *et al.*, 1997). Com 15 espécies de peixes, reconhecidas por características externas, dentre as quais o padrão de coloração e merística são as mais importantes, os *Cichla*, endêmicos dos rios das bacias Amazônica, Tocantins e Orinoco, estão amplamente distribuídos pelos rios e açudes da região Norte e Nordeste, bacias dos rios Grande, Tietê e Alto Paraná, na região Sudeste do Brasil, bacias do rio Piquirí e São Lourenço, na região Centro-Oeste do Brasil, além de serem encontrados em países como Bolívia, Peru, Venezuela, Estados Unidos (Flórida), Panamá, Havaí e mais recentemente na Malásia, onde foram introduzidos para cultivo, programas de repovoamento, mas principalmente para a pesca esportiva, motivado por sua voracidade e tenacidade, pois como mencionado por Dieter Kelber (1999) “poucos peixes têm uma capacidade como a do tucunaré que, além de ser um predador nato, nos brinda com um espetáculo de beleza de cores, astúcia, valentia e com um verdadeiro show quando físgados”. Por este motivo o tucunaré é considerado o símbolo da pesca esportiva no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2001; WINEMILLER, 2001; NÓBREGA, 2003; KULLANDER & FERREIRA, 2006; MUÑOZ, *et al.*, 2006).

Entretanto, sua introdução aos novos ambientes, tem acarretado a extinção de muitas espécies nativas, levando a diversidade da comunidade ictia local ao declínio, como mostrado por Zaret & Paine (1973) que relatam uma diminuição a menos de 50% da abundância de quase todas as espécies de peixes nativos do lago Gatun no Panamá, após a dispersão de *Cichla ocellaris* nesse ambiente. Godinho *et al.* (1994), também reporta este efeito quando descreve o desaparecimento de pequenas espécies de peixes nos lagos de rio Doce, Minas Gerais, que são colonizados por *Cichla ocellaris*. Assim como Santos *et al.* (1994) que constataram que o tucunaré *Cichla* sp. e a corvina, *Plagioscion squamosissimus*, ambas exóticas para a região, estão dominando a comunidade ictia nos reservatórios de Furnas e Marimondo na bacia do rio Paraná. A principal causa do desaparecimento das espécies locais é a predação voraz realizada pelos tucunarés, que é considerado o maior predador da América do Sul (WINEMILLER *et al.*, 1997)

Ao longo de sua vida, os tucunarés são peixes miméticos, adaptando-se às estruturas ambientais em que se encontram. Quando alevino apresenta um traço horizontal na lateral, pois vive mais na superfície da água. Quando jovem, tem quase sempre muitas pintas brancas, confundindo-se, deste modo, com o cascalho do fundo dos lagos e remansos. Por essa condição, é chamado em diversas regiões de tucunaré-paca, paquinha, etc., numa alusão à semelhança com o aspecto de uma paca jovem, com pintas. Ao se tornar adulto, acentuam-se suas barras verticais, adaptando-se, assim, às águas mais profundas. (KELBER, 1999).

Além das barras verticais, presentes em todas as espécies do gênero *Cichla*, diferindo apenas no número presente em cada espécie, os tucunarés apresentam algumas características comuns, como a presença de um ocelo em sua nadadeira caudal; o aparecimento de uma protuberância cefálica pós-occipital, formada por acúmulo de tecido adiposo, também conhecida como gibosidade, em machos no início da maturidade sexual; preferência por ambientes lênticos para a reprodução; além da participação de ambos, macho e fêmea, na construção e limpeza do ninho e, durante o período de cuidado parental dispensado à prole, que vai até, aproximadamente, os dois meses de idade, quando os filhotes atingem um comprimento médio de 6 cm, e o ocelo caudal e as barras verticais começam a aparecer (MAGALHÃES *et al.*, 1996; ANTONELI, 1999; KELBER, 1999; CHELLAPPA *et al.*, 2003; GOMIEIRO & BRAGA, 2004; KULLANDER & FERREIRA, 2006; MUÑOZ *et al.*, 2006).

Dentre as nove novas espécies de tucunaré, recentemente descritas por Kullander e Ferreira (2006) em seu trabalho de revisão do gênero *Cichla*, o *Cichla kelberi*, espécie conhecida como tucunaré amarelo no estado de São Paulo e tucunaré comum no nordeste brasileiro, recebeu este nome em reconhecimento ao trabalho de Dieter Kelber, que além de apoiar o estudo com informações e imagens da espécie, promoveu o gênero *Cichla* como peixes esportivos. (FONTENELE, 1948; KELBER, 1999; KULLANDER & FERREIRA, 2006).

O *C. kelberi* tem sido alvo de constante confusão com *C. monoculus* e *C. pleizona*, as duas espécies de tucunaré mais semelhantes, entretanto, distingue-se desta e das demais espécies de *Cichla* por apresentar, quando adultos, pequenas manchas claras nas nadadeiras pélvica e anal, e no lobo inferior da nadadeira caudal (KULLANDER & FERREIRA, 2006). Outras características notáveis desta espécie são a presença de três barras verticais escuras nos flancos, uma barra occipital pronunciada nos indivíduos de maior porte, ausência de marcas escuras ou ocelares laterais à cabeça e manchas escuras irregulares na região anterior do abdome (KULLANDER & FERREIRA, 2006). Sua distribuição geográfica original são as

bacias do rio Araguaia e baixo Tocantins, entretanto, Kelber (1999) listou-a nas bacias do Alto Paraná no Brasil, Rio Paraíba do Sul e Rio São Francisco onde apresenta grande importância para a pesca profissional por seu alto valor econômico, por estar entre as espécies mais apreciadas pela culinária, sendo freqüentemente referida, como uma das melhores carnes entre os peixes de água doce, e pela pesca esportiva, como pode ser observado pelos campeonatos anuais de pesca ao tucunaré, como ocorre no reservatório de Jupia, no município de Ilha Solteira - SP.

I. 1. Morfologia Testicular

Os peixes teleósteos representam aproximadamente 96% de todas as espécies de peixes conhecidas, tendo alcançado sucesso nos ambientes aquáticos mais diversos, nos quais tanto as condições bióticas, como disponibilidade de alimento e pressão de predação, quanto às abióticas, como temperatura, fotoperíodo, oxigênio disponível, etc., variam amplamente no espaço e no tempo. Esta adaptabilidade a habitats distintos reflete na grande diversidade de formas, tamanhos, padrões de ciclo de vida e, principalmente, no tipo de reprodução adotada por cada espécie do grupo, que apresenta as mais variadas e diversificadas estratégias reprodutivas dentre os vertebrados, incluindo todos os mecanismos de reprodução sexuada conhecidos, como é o caso do gonocorismo (predominante neste grupo), além de alguns, como superfecundação e ginogênese, únicos no reino animal. Ademais, em algumas espécies os mecanismos reprodutivos envolvem o desenvolvimento de órgãos especializados para a fecundação interna, enquanto a maioria adota a liberação de gametas no ambiente aquático, para a fecundação externa. Apesar das inúmeras estratégias reprodutivas, a maioria dos teleósteos, inicia o desenvolvimento gonadal em uma época anterior aquela de reprodução, completando sua maturação no momento em que as condições ambientais forem adequadas à fecundação e desenvolvimento da prole (NAGAHAMA, 1983; PUDNEY, 1995; VAZZOLER, 1996; LE GAC & LOIR, 1998; NOBREGA, 2003; VERISSIMO-SILVEIRA, 2003; OYAKAWA *et al.*, 2006).

Como resultado desta grande diversidade reprodutiva, os peixes apresentam diferentes tipos morfológicos de sistemas reprodutivos e estruturas gonadais, principalmente se tratando de testículos. Entretanto, na maioria dos teleósteos com fecundação externa, os testículos são órgãos predominantemente pares e alongados, situados no celoma, caudalmente aos rins e dorsalmente ao canal alimentar, sendo sustentados por uma fina camada de peritônio,

chamada mesórquio. São individualizados por toda a sua extensão e se unem em sua extremidade caudal, convergindo para o exterior por meio do poro urogenital (ALEXANDRINO *et al.*, 1985; SELMAN & WALLACE, 1986; LÊ GAC & LOIR, 1999; NOBREGA, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003; GRIER & ARANZÁBAL, 2009).

A superfície externa das gônadas é lisa, sendo os seus volumes, formas e coloração variáveis com o desenvolvimento gonadal; microscopicamente é envolvida por um tecido conjuntivo, nomeado túnica albugínea, que emite projeções para o interior do órgão, originando o compartimento intertubular ou intersticial, que delimita um segundo compartimento, chamado compartimento tubular. No compartimento intersticial estão presentes células esteroideogênicas de Leydig, células mióides, macrófagos, células tronco, vasos sanguíneos e células do tecido neural e conectivo; o compartimento tubular é delimitado por uma membrana basal, e compreende um epitélio germinativo, composto por apenas dois tipos celulares, as células somáticas de Sertoli e as células germinativas que se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides), limitando uma cavidade ou lúmen. A organização dos testículos em compartimento intertubular e tubular é uma característica altamente conservada em vertebrados, ocorrendo de peixes a mamíferos (GRIER, 1981; ALEXANDRINO *et al.*, 1985; GRIER, 1993; GRIER & LO NOSTRO, 2000; VICENTINI *et al.*, 2001; BROWN-PETERSON *et al.*, 2002; GRIER, 2002; VERISSIMO-SILVEIRA, 2003; LO NOSTRO *et al.*, 2004; BATLOUNI *et al.*, 2006; NOBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010).

Os estudos detalhados da estrutura dos testículos dos teleósteos são conduzidos desde longa data. Entretanto, somente no ano de 1993 Grier, com base na morfologia comparada das diferentes classes de Chordados, acabou com a confusão existente na literatura entre os termos “lóbulo” e “túbulo”, que até então eram utilizados de forma indiscriminada pelos cientistas (GRIER *et al.*, 1980; GRIER, 1981; FRAILE *et al.*, 1992). Deste modo, o testículo dos peixes, foi classificado em tubular anastomosado, no qual os compartimentos germinativos são interconectados, formando uma rede altamente ramificada, que não termina na periferia testicular e, em lobular, caracterizado pela presença de um epitélio germinativo confinado em compartimentos, que terminam em fundo cego na periferia do testículo. O primeiro tipo testicular é encontrado em teleósteos filogeneticamente mais basais, enquanto isso, o segundo está presente nos Neoteleósteos, filogeneticamente mais derivados. Além disso, baseando-se na distribuição das espermatogônias primárias ao longo do compartimento germinativo, o testículo do tipo lobular foi dividido em outros dois diferentes tipos: lobular

espermato gonial irrestrito, que apresenta um padrão mais primitivo, sendo encontrado em grupos taxonômicos mais basais, como nas ordens Synbranchiformes e Perciformes e; lobular espermato gonial restrito, presente apenas nos teleósteos mais derivados, pertencentes às ordens Atheriniformes, Cyprinodontiformes e Beloniformes (GRIER, 1993; LE GAC & LOIR, 1998; PARENTI & GRIER, 2004; GRIER & ARANZABAL, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). Entretanto, um terceiro tipo, intermediário entre o espermato gonial restrito e irrestrito, parece existir. Neste, espermato gônias indiferenciadas mostram uma preferencial, porém não exclusiva localização próxima a túnica albugínea (SCHULZ *et al.*, 2010). Este tipo de distribuição espermato gonial foi encontrado para o Perciformes *Oreochomis niloticus* (VILELA *et al.*, 2003), no Pleuronectiformes *Solea senegalensis* (GARCIA-LOPEZ *et al.*, 2005) e no Gardiformes, *Gadus morhua* (ALMEIDA *et al.*, 2008).

A espermatogênese, termo inicialmente utilizado por Rossen-Runge (1962), é um complexo e coordenado processo de transformação, no qual espermato gônias diplóides sofrem proliferação e diferenciação para produzir células germinativas masculinas haplóides, chamadas espermato zóides. Em anamniotas (peixes e anfíbios), este processo se desenvolve no interior de unidades funcionais, chamadas cistos ou espermato cistos, formados por um dinâmico grupo de células de Sertoli que envolve e nutre células germinativas em desenvolvimento sincrônico. Este sincronismo entre as células germinativas de um mesmo cisto é resultado de citocineses incompletas, sofridas durante as primeiras divisões mitóticas das espermato gônias primárias, que se mantêm interconectadas por pontes citoplasmáticas (GRIER *et al.*, 1980; PUDNEY, 1995; LE GAC & LOIR, 1998; VERISSIMO-SILVEIRA, 2003; MONTOYA-LOPEZ *et al.*, 2006; MATTA *et al.*, 2009; NOBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). A espermatogênese pode ser dividida em três fases principais, nos teleósteos: 1) proliferativa ou espermato gonial, na qual as espermato gônias passam por rápidas e sucessivas divisões mitóticas; 2) meiótica ou espermato citária, na qual o material genético é duplicado, recombinado e segregado e 3) diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides passam por drásticas mudanças morfológicas e fisiológicas para formação do espermato zóide (LO NOSTRO *et al.*, 2003b; NOBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010).

As alterações do epitélio germinativo masculino têm sido utilizadas para definição das classes reprodutivas, durante o ciclo reprodutivo anual das espécies de peixe (GRIER & TAYLOR, 1998; GRIER, 2002), complementando a tradicional escala de aplicação geral para o período de proliferação testicular, proposta por Vazzoler (1981), com base em aspectos macroscópicos. Elas são definidas com base na alternância do epitélio germinativo em

contínuo e descontínuo, associado aos estágios das células germinativas presentes no testículo. Um epitélio germinativo contínuo se constitui de uma população contínua de células de Sertoli e células germinativas que se estendem ao longo de todo o comprimento dos lóbulos ou túbulos. Já o epitélio germinativo descontínuo, caracteriza-se pela perda das células germinativas quando os espermatozóides sofrem espermição, ou seja, quando são expelidos dos espermatozoides para a luz do compartimento germinativo (GRIER, 1993; GRIER & TAYLOR, 1998; GRIER, 2002; GRIER & LO NOSTRO, 2000; BROWN-PETERSON *et al.*, 2002; NOBREGA, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003). Seguindo esta metodologia cinco classes reprodutivas (Regredido, Maturação Inicial, Maturação Intermediária, Maturação final e Regressão) foram definidas durante o ciclo reprodutivo anual de *Centropomus undecimalis* (GRIER & TAYLOR, 1998), *Rachycentron canadun* (BROWN-PETERSON *et al.*, 2002), *Cynoscion nebulosus* (BROWN-PETERSON & WARREN, 2001), *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO *et al.*, 2003a), *Serrasalmus espiopleura* (NOBREGA, 2003); *Salminus brasiliensi* (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003) e *Gymnotus carapo* (ISHIBA *et al.*, 2010).

Com relação à ultraestrutura da espermatogênese, inúmeros estudos têm sido realizados com o propósito de disponibilizar caracteres que possam ajudar a esclarecer relações filogenéticas entre as espécies de peixes. Estes estudos têm sido conduzidos, particularmente, durante a espermiogênese, e com os próprios espermatozóides, devido à grande divergência em sua forma e estrutura. (BILLARD, 1970; MATTEI, 1970; BRUSLÉ, 1981; BILLARD, 1983; BACCETTI *et al.*, 1984; CRUZ-LANDIM & CRUZ-HÖFLING, 1986/1987; THAW *et al.*, 1990; JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991; WEITZMAN & MALABARBA, 1998; ANTONELI, 1999; FALUGI *et al.*, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2001; GUSMÃO-POMPIANI, 2003; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA *et al.*, 2006; SPADELLA, 2007; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007; GUSMÃO-POMPIANI *et al.*, 2009; PSENICKA *et al.*, 2010; SPADELLA *et al.*, 2010).

A espermiogênese pode ser classificada em Tipo I ou Tipo II, dependendo da presença ou ausência de rotação nuclear, respectivamente, levando a formação de dois diferentes tipos de espermatozóides. No espermatozóide do Tipo I, o eixo flagelar se posiciona perpendicularmente em relação ao núcleo, enquanto no espermatozóide do Tipo II, o eixo flagelar é paralelo ao núcleo (MATTEI, 1970; JAMIESON, 1991). Ademais, Jamieson (1991) classificou o espermatozóide em “aquasperma” e “introsperma”, baseando-se na fertilização externa ou interna, respectivamente. Os espermatozóides do tipo “aquasperma” possuem uma

cabeça arredondada e uma pequena peça intermediária com poucas mitocôndrias, enquanto os “introspermas” são caracterizados por uma cabeça alongada e outras características derivadas, como a ausência de peça intermediária, ausência de rotação nuclear, cabeça mais ou menos paralela ao flagelo e as mitocôndrias localizadas na extremidade posterior da cabeça (JAMIESON 1991; MATTEI 1991). Em ambos os tipos de espermatozóide não há presença de acrossoma, o que é provavelmente compensado pela presença de uma abertura no oócitos, chamada micrópila, permitindo a passagem do espermatozóide no momento da fertilização (MATTEI, 1991; SHAHIN, 2006). Além disso, os espermatozoides de peixes ainda podem ser biflagelados, uniflagelados e até mesmo aflagelados (BACCETTI *et al.*, 1984; BACCETTI, 1986)

Apesar da enorme variedade de formas, tamanhos e estruturas, cada espécie é caracterizada por uma organização particular das organelas espermáticas, num padrão geral uniforme, comum para toda família. (MATTEI, 1970; MATTEI, 1991; BACCETTI *et al.*, 1984). Deste modo, os estudos da ultraestrutura da espermatogênese e dos espermatozoides em peixes, podem ser utilizados como um instrumento complementar aos estudos morfológicos e moleculares, para um melhor entendimento das relações filogenéticas entre as espécies.

II. OBJETIVOS

II. 1. Geral:

Considerando a rápida adaptação e grande importância econômica da espécie, tanto para a pesca profissional e esportiva como para a aquicultura, o trabalho proposto descreve o ciclo reprodutivo masculino e a ultraestrutura da espermatogênese do ciclídeo Neotropical *Cichla kelberi* (KULLANDER & FERREIRA, 2006), pois o conhecimento dos estudos básicos acerca da biologia reprodutiva desta espécie pode ser aplicado na solução de problemas na aquicultura e em áreas afins, como sistemática e ecologia.

II. 2. Específicos:

- Realizar a caracterização testicular e definir as classes reprodutivas do *Cichla kelberi*, com base nas alterações do epitélio germinativo em contínuo e descontínuo;
- Realizar estudos histoquímicos do testículo para detecção de glicosaminoglicanas, com auxílio de reações de Ácido Periódico-Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB), e respectivas reações de bloqueio;
- Realizar a análise ultraestrutural da espermatogênese de *Cichla kelberi*.

III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRINO, A.C.; PHAN, M. T.; PINHEIRO, E. F. G. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. **Bol. Zool. Univ. S. Paulo.** v. 9, p. 159-175, 1985.

ALMEIDA, F. F. L.; KRISTOFFERSEN, C.; TARANGER, G. L.; SCHULZ, W. Spermatogenesis in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): A Novel Model of Cystic Germ Cell Development. **Biology of Reproduction.** v. 78, p. 27-34, 2008.

ANTONELLI, F. N. **Aspectos Ultraestruturais da Espermatogênese no Tucunaré, *Cichla intermédia*, do Reservatório de Volta Grande (Rio Grande, MG).** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Botucatu. 1999.

BACCETTI, B.; BURRINI, A. G.; CALLAINI, G.; GILBERTINI, G.; MAZZINI, M.; ZERUNIAN, S. Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. **Gamete Research.** v. 10, p. 373-96, 1984.

BACCETTI, B. Evolutionary trends in sperm structure. – **Comparative Biochemistry and Physiology.** v. 85, p. 29-36, 1986.

BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive Cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei: Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science.** v. 96, p. 116-132, 2006.

BILLARD, R. Ultrastructure compare de spermatozoids de quelques poissons teleosteens. In: BACCETTI, B. **Comparative Spermatology.** p. 71-80, 1970.

BILLARD, R. Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) – An ultrastructural study. **Cell Tissue Res.** v. 233, n. 2, p. 265-284, 1983.

BROWN-PETERSON, N. J.; WARREN, J. W. The Reproductive Biology of the Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus*, Along the Mississippi Gulf Coast. **Gulf of Mexico Science.** v. 1, p. 61-73, 2001.

BROWN-PETERSON, N. J.; GRIER H. J.; OVERSTREET, R. M. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. **Journal of Fish Biology**. p. 178-202, 2002.

BRUSLÉ, S. Ultrastructure of Spermiogenesis in *Liza aurata* Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae). **Cell Tissue Res.** v. 217, p. 415-424, 1981.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. 2007. Museu Nacional, Rio de Janeiro. 195p.

CHELLAPPA, S., M. R. CÂMARA, N. T. CHELLAPPA, M. C. M. BEVERIDGE & F. A. HUNTINGFORD. Reproductive ecology of a Neotropical cichlid fish, *Cichla monoculus* (Osteichthyes: Cichlidae). **Brazilian Journal of Biology**. v. 63, n. 1, p. 17-26, 2003.

CRUZ-LANDIM, C.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Aspectos da espermatogênese de tucunaré, *Cichla ocellaris* Schneider, 1801 (TELEOSTEI, CICHLIDAE). **Acta Amazônica**. v. 16/17, n. (único), p. 65-72, 1986/1987.

FALUGI, C.; BACCETTI, B.; RENIERI, T.; MORETTI, E.; ANGELINI, C.; CAMPANELLA, C.; PISANO, E.; PIOMBONI, P. Ultrastructural analysis of the spermatozoa of three Antarctic fish species. **J Submicrosc. Cytol. Pathol.** v. 31, n. 2, p. 197-202, 1999.

FARIAS, I. P.; ORTI, G.; MEYER, A. Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes. **J. Exp. Zool.** v. 288, p. 76–92, 2000.

FONTENELE, O. Um caráter sexual secundário extragenital nos tucunarés (Actinopterygii, Cichlidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 8, p. 185-188, 1948.

FRAILE, B.; SÁEZ, F. J.; VICENTINI, C. A.; MIGUEL, M. P.; PANIAGUA, R. The testicular cycle of *Gambusia affinis holdbrooki* (Teleostei: Poeciliidae). **J. Zool. Lond.** V. 228, 115-126, 1992.

GARCÍA-LÓPEZ, Á.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; SARASQUETE, C. Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry. **Histol. Histopathol.** v. 20, p. 1179–1189, 2005.

GODINHO, A. L.; FONSECA, M. T.; ARAÚJO, L. M. The ecology of predator fish introductions: the case of Rio Doce Valley Lakes. In: PINTO-COELHO, R.M.; GIANI, A.; VON SPERLING, E. **Ecology and human impacts on lakes and reservoirs in Minas Gerais with special reference to future development and management strategies.** Belo Horizonte: SEGRAC, 1994, p. 77-83.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. Reproduction of species of the genus *cichla* in a reservoir in southeastern brazil. **Brazilian Journal of Biology.** v. 64, n. 3, p. 613-624, 2004.

GRIER, H.J.; LINTON, J. R.; LEATHERLAND, J. F.; VLAMING, V. L. Structural evidence for two different testicular types in Teleost fishes. **The American Journal of Anatomy.** p. 331-345, 1980.

GRIER, H.J. Cellular Organization of the Testis and Spermatogenesis in Fishes. **Am. Zool.** v. 21, p. 345-357, 1981.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cells barrier. In: RUSSELL, Id., GRISWORLD, M.D. **The Sertoli Cell.** Clearwater, FL: Cache River Press, p. 704-739, 1993.

GRIER, H J; TAYLOR, R G. Testicular maturation and regression in the *common snook*. **Fish Biology.** v. 53, p. 521-542, 1998.

GRIER, H.J.; LO NOSTRO, F. The teleost germinal epithelium: a unifying concept. In: **Proceedings of the sixth international Symposium on the Reproductive Physiology of Fish,** Begen: University of Bergen. 2000, p. 233-236.

GRIER, H, J. The Germinal Epithelium: Its Dual Role in Establishing Male Reproductive Classes and Understanding the Basis for indeterminate Egg Production in Female Fishes. **Institute of Marine Sciences, Univertsity of Southern Mississippi.** v. 53, p. 537-552, 2002.

GRIER, H. J.; ARANZABAL, M. C. U. The Testis and Spermatogenesis in Teleosts. In: Jamieson, B. G. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)** 2009. Cap. 4, p. 120-142.

GUSMÃO-POMPIANI, P. G. **Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da Ordem Characiformes, Família Characidae (Teleostei, Ostariophysi): uma abordagem filogenética.** Tese (Doutorado). IBB - Universidade Estadual Paulista. 2003.

GUSMÃO-POMPIANI, P.; MALABARBA, L. R.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in Serrasalminae (Ostariophysi: Characiformes) with further evidence on the relationships of the piranhas e pacus. **Neotropical Ichthyology**. v. 7, p. 385-394, 2009.

ISHIBA, R.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; FRANÇA, G. F. Aspectos estruturais do desenvolvimento gonadal e relação gonadossomática de machos e fêmeas ao longo do ciclo reprodutivo anual em *Gymnotus carapo* cf. *carapo* (TELEOSTEI: GYMNOTIFORMES: GYMNOTIDAE). In: XXI Congresso de Iniciação Científica (CIC) – UNESP, 2009. **Anais do XXI CIC**, 2010, p.1-10.

JAMIESON, B. G. M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa.** 1991. Cambridge: Cambridge University Press. 319p.

KELBER, D. Tucunará uma paixão internacional. 1999. Arte & Ciência. São Paulo, 1999.

KULLANDER, S. O.; FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyological Exploration Freshwater**, v.17, p. 298-398, 2006.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male Reproductive System, Fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction.** San Diego: Academic Press. v. 3, p. 20-30, 1999.

LO NOSTRO, F.; GRIER, H.; GUERRERO, G. A. Involvement of the Gonadal Germinal Epithelium During Sex Reversal and Seasonal Testicular Cycling in the Protogynous Swamp Eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). **Journal of Morphology**. p. 107-126, 2003a.

LO NOSTRO, F. L.; GRIER, H.; MEIJIDE, F. J.; GUERRERO, G. A. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Synbranchidae): the germinal compartment. **Tissue & Cell**. v. 35, p. 121-132, 2003b.

LO NOSTRO, F. L.; ANTONELI, F. N.; QUAGIO-GRASSIOTO, I.; GUERREIRO, G. A. Testicular interstitial cells, and steroidogenic detection in the protogynous fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). **Tissue & Cell**. v. 36, p. 221-231, 2004.

MAGALHÃES, A. L. B.; SATO, Y.; RIZZO, E.; FERREIRA, R. M. A.; BAZZOLI, N. Ciclo reprodutivo do tucunaré *Cichla ocellaris* (Schneider, 1801), na represa de Três Marias, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 48, p. 85-92, 1996.

MATTA, S. L. P.; GOMES, M. C. M.; ANDRADE, D. R. Reproductive Biology of the *Olygosarcus argenteus* (Gunther, 1864) Adult Males and Description of the Gonadal Maturation Stages. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 52, p. 119-126, 2009.

MATTEI, X. Spermiogenèse comparée des poisson. In: BACCETTI, B. **Comparative Spermatology**. Academic Press, New York, 1970. p. 57-70.

MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Can. J. Zool.**, v. 69, p. 3038-55, 1991.

MONTOYA-LÓPEZ, A. F.; TABARES, C. J.; ECHEVERRI, A.; ARBOLEDA, L.; OLIVERA-ÁNGEL, M. Descripción anatómica e histológica de las gónadas en Sabaleta (*Brycon henni*, Eigenmann 1913) **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**. v.19, n. 2, p. 187-195, 2006.

MUÑOZ, H.; VAN DAMME, P. A.; DUPONCHELLE, F. Breeding behavior and distribution of the tucunare *Cichla aff. monoculus* in a clear water river of the Bolivian Amazon. **Journal of Fish Biology**. v. 69, 1018-1030, 2006.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish Physiology**, New York: Academic Press. 1983. p. 223-276.

NASCIMENTO, F. L.; CATELLA, A. C.; MORAES, A. S. Distribuição especial do Tucunaré, *Cichla* sp. (Pisces, Cichlidae), peixe Amazônico introduzido no Pantanal, Brasil. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa. 2001. 15p.

NOBREGA, R. H. **Capacidade suporte das células de Sertoli e alterações do epitélio germinativo masculino e do tecido intersticial durante o ciclo reprodutivo de peixes neotropicais**. Monografia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. 2003.

NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemical**. v. 35, p. 197-206, 2009.

OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K. C.; NOLASCO, J. C. **Peixes de Riachos da Mata Atlântica**. 2006. NEOTRÓPICA. São Paulo. 201p.

PARENTI, L. R.; GRIER, H. J. Evolution and Phylogeny of Gonad. Morphology in Bony Fishes. **Integr. Comp. Biol.** v. 44, p. 33–348. 2004.

PSENICKA, M.; RODINA, M.; LINHART, O. Ultrastructural study on the fertilization process in sturgeon (Acipenses), function of acrosome and prevention of polyspermy. *Animal Reproduction Science*. v. 117, n. ½, p. 147-154, 2010.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. **Microscopy Research and Technique**. v. 32, p. 459-497, 1995.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; NEGRÃO, J. N. C.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). **J. Fish Biol.** v. 59, p. 1494-502, 2001.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GAMEIRO, M. C.; SCHNEIDER, T.; MALABARBA, L. R.; OLIVEIRA, C. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the Curimatidae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the Characiformes. **Neotropical Ichthyology**. v.1, n 1, p. 35-45, 2003.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS. Porto Alegre. 742p.

RICAN, O.; KULLANDER, S. O. Character- and tree-based delimitation of species in the *Cichlasoma facetum* group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. **J. Zool. Syst. Evol. Res.** v. 44, p. 136–152, 2006.

ROOSE-RUNGE, E. C. The process of spermatogenesis in mammals. **Biol. Rev.** v. 37, p. 343-377, 1962.

SANTOS, G. B.; MAIA-BARBOSA, P. M.; VIEIRA, F.; LÓPEZ, C. M. Fish and Zooplankton community structure in reservoirs of southeastern Brazil: Effects of the introduction of exotic predatory fish. In: PINTO-COELHO, R. M.; GIANI, A.; VON SPERLING, E. **Ecology and human impacts on lakes and reservoirs in Minas Gerais with special reference to future development and management strategies**. Belo Horizonte: SEGRAC, 1994, p. 77-83.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LE GAC, F. CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**. v. 165, p. 390-411, 2010.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **Amer Zool.** Florida, v. 26, p. 173-192, 1986.

SHAHIN, A. A. B. Spermatogenesis and Spermatozoon ultrastructure in the Nile Pebblyfish *Alestes dentex* (Teleostei: Characiformes: Alestidae) in Egypt. **W. J. Zoology**. v.1, p.1-16, 2006.

SPADELLA, M. A.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Morphology and Histology of Male and Female Reproductive Systems in the Inseminating Species *Scoloplax distolothrix* (Ostariophysi: Siluriformes: Scoloplacidae). **Journal of Morphology**. v. 269, p.: 1114-1121, 2007.

SPADELLA, M. A.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in Trychomycteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes). **Acta Zoologica (Stockholm)**, v. 91, p. 373-389, 2010.

SPARKS, J.S.; SMITH, W.L. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). **Cladistics**. v. 20, p. 501–517, 2004.

THAW, O.T.; THIAM, D. MATTEI, X. Extension of proximal centriole in a teleost fish spermatozoon. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** v. 22, p. 357-360, 1990.

VAZZOLER, A. E. A. DE M. Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes; reprodução e crescimento. Brasília, CNPq. Programa Nacional de Zoologia, 1981.. 108p.

VAZZOLER, A. E A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringa: Eduem, 1996.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do Dourado (*Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849)**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; GUSMÃO-POMPIANI, P.; VICENTINI, C. A.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoológica (Stockholm)**. v. 87, p. 305-313, 2006.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ultraestrutura da Espermiogênese e dos Espermatozóides de peixes da Subordem Characoidei (Teleostei, Characiformes): uma abordagem filogenética**. 2007.131f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

VICENTINI, C. A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; BENETTI, E. J.; ORSI, M. Testicular ultrastructure and morphology of the seminal pathway in *Prochilodus scrofa*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** v. 33, p. 357-362, 2001.

VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 28, p. 187-190, 2003.

WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. R. Perspectives about the Phylogeny and Classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. **Phylogeny and Classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p.161-169.

WINEMILLER, K. O. Ecology of peacock cichlids (*Cichla* spp.) in Venezuela. **Journal of Aquariculture and Aquatic Sciences**. v. 9, p. 93-112, 2001.

ZARET, T. M.; PAINE, R. T. Species introduction in a tropical lake. **Science**. v. 182, p. 449-455, 1973.

CAPÍTULO 1

Ciclo reprodutivo anual do tucunaré amarelo *Cichla kelberi* (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Jupia, rio Paraná, São Paulo, Brasil.

Ciclo reprodutivo anual do tucunaré amarelo *Cichla kelberi* (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) no Reservatório de Jupia, rio Paraná, São Paulo, Brasil.

Diógenes Henrique de Siqueira Silva, Carlos Alberto Vicentini, Rosicleire Veríssimo-Silveira.

RESUMO

Estudos morfológicos das gônadas dos Teleósteos têm sido conduzidos, com o objetivo de identificar aspectos de sua biologia reprodutiva, tal como o ciclo reprodutivo anual das espécies. Deste modo, com o objetivo de caracterizar o ciclo reprodutivo anual de *Cichla kelberi* no Reservatório de Jupia, rio Paraná, Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 78 exemplares desta espécie foram mensalmente coletados, entre março de 2009 e fevereiro de 2010, com o auxílio de vara de pesca e anzol na Lagoa do Pernilongo (20° 29' 11,93"S, 51° 25' 33,27"O) e Ilha da Ferradura (20° 28' 27,11" S, 51° 25' 54,53"O). As análises histológicas dos testículos desta espécie, permitiram classificá-los como do tipo lobular espermatogonial irrestrito, além da definição de quatro classes reprodutivas para seu ciclo reprodutivo anual desta. As Classes de Maturação Inicial, Intermediária, Final e Regressão, foram definidas com base nas alterações do epitélio germinativo testicular, e nos estágios das células germinativas. A Classe de Maturação Inicial é caracterizada pela presença de um epitélio germinativo totalmente contínuo, cistos contendo células germinativas em desenvolvimento parcialmente sincrônico durante a espermatogênese, intensa atividade espermatogênica e raros "clusters" ou agrupamentos espermatogoniais na periferia dorsal do testículo, na região de fundo cego dos lóbulos. A Classe de Maturação Intermediária inicia com o surgimento de uma descontinuidade do epitélio germinativo na região anastomosada, diminuindo a espermatogênese e iniciando a estocagem de espermatozóides na região. Os "clusters" estão ausentes ao final desta Classe de maturação. Na Maturação Final, a descontinuidade do epitélio germinativo atinge a periferia lobular. E, embora ducto testicular principal e região anastomosada somente estoquem espermatozóides, a espermatogênese continua na periferia testicular. Os "clusters" estão presentes ao final desta fase. Na Regressão, todos os lóbulos apresentam descontinuidade em seu epitélio germinativo, o número de cistos é reduzido (alguns espermatogênicos), espermatozóides residuais se dispersam pela gônada, e espermatogônias primárias passam por proliferação, inclusive nos

inúmeros “clusters”. A atividade reprodutiva anual de *C. kelberi* no Reservatório de Jupia atingiu seu pico nas estações de chuvas e temperaturas elevadas durante a primavera e, principalmente, verão, entre setembro de 2009 e fevereiro de 2010, ocorrendo, entretanto, um pico reprodutivo menor nos meses de maio e junho de 2009, durante o outono, caracterizando a reprodução desta espécie como do tipo parcelada.

Palavras-Chave: classes reprodutivas; epitélio germinativo; espermatogênese.

ABSTRACT

Morphological studies of the Teleostei gonads have been conducted, aiming identify the aspects of the reproductive biology, like the annual reproductive cycle of the species. Thus to characterize the annual reproductive cycle of *Cichla kelberi* in the Jupia Reservoir, Paraná River, Ilha Solteira, São Paulo, Brazil, 78 specimen of this specie were monthly caught between March 2009 and February 2010, with fishing pole and hook from the Lagoa do Pernilongo (20° 29' 11,93"S, 51° 25' 33,27"W) and Ilha da Ferradura (20° 28' 27,11" S, 51° 25' 54,53"W). The histological analyses of this of specie's testes allowed us classifying it as lobular espermatogonial unrestricted type, besides the definition of four gonadal maturation class to its annual reproductive cycle. The classes of Early Maturation, Mid Maturation, Final Maturation and Regression, were defined based on the changes of the testicular germinal epithelium and in the germ cell stages. The Class of Early Maturation is characterized by the presence of a fully continuous germinal epithelium, cysts with germ cells in partially synchronic development during the spermatogenesis, intense spermatogenic activity throughout the testis and rare spermatogonial "clusters" or espermatogonial groups in the periphery of the testes, in the blind ends of the lobules. The Mid maturation Class starts with the appearance of a discontinuous germinal epithelium in the anastomosed region, decreasing the spermatogenesis and starting the spermatozoon storage in this region. The "clusters" are missing at the end of this class of maturation. In the Final maturation the germinal epithelium discontinuity reaches the lobular periphery. Although the testicular main duct and anastomosed region act only storing sperm, spermatogenesis continues in the testicular periphery. The "clusters" are present at the end of this phase. In the Regression all lobes shown discontinuity in the germinal epithelium, few cysts are present (some spermatogenic), and waste sperm are scattered across the length gonadal and primary spermatogonia undergoes proliferation including in the numerous "clusters". The reproductive activity of *C. kelberi* in Jupia Reservoir reached its peak in seasons of rain and higher temperatures during the spring season and principally in the summer, between September 2009 and February 2010, occurring, however, a lower reproductive peak during May and June 2009 in the autumn season, characterizing the reproduction of this species as the multiple type.

Key-Words: reproductive classes; germinative epithelium; spermatogenesis.

INTRODUÇÃO

Estudos morfológicos das gônadas dos Teleósteos têm sido conduzidos há um longo tempo, com o objetivo de identificar aspectos da biologia reprodutiva deste grupo, tais como ritmos de desova, fecundidade, início da maturação reprodutiva, duração da estação de reprodução, além do ciclo reprodutivo anual, que é definido com base nas classes de maturação gonadal (classes reprodutivas) presentes ao longo do ano (PARENTI & GRIER, 2004).

O critério tradicional utilizado para definição das classes reprodutivas leva em consideração a predominância dos estágios de desenvolvimento das células germinativas, presentes nos testículos a cada momento do ciclo reprodutivo de uma espécie (BATLOUNI *et al.*, 2006). Vieira *et al.* (2009), por exemplo, utilizaram este critério para definir as Classes de Repouso, Maturação inicial, Maturação avançada e Parcialmente esvaziado para o tucunaré azul *Cichla piquiti*. Entretanto, a terminologia adotada para a definição das Classes reprodutivas varia entre os diferentes autores, como pode ser observado pelas espécies de *Cichla* que tiveram seu ciclo reprodutivo descrito. Em *C. monoculus* utilizou-se as características sexuais secundárias e o Índice Gonadossomático (CHELLAPPA *et al.*, 2003), já em *C. ocellaris* e *C. monoculus* definiram-se as Classes imaturo, em maturação, maduro e esgotado analisando apenas os aspectos macroscópicos das gônadas (GOMIEIRO & BRAGA, 2004). Para *C. kelberi* foram definidas as Classes de Repouso, Em maturação, Em Reprodução e Esgotado, com base nas análises macroscópicas das gônadas, nos estágios das células germinativas, além da presença ou ausência de gibosidade (SOUZA, 2007). Já Gomieiro *et al.* (2009), considerando aspectos macroscópicos dos testículos, como, coloração, transparência e vascularização superficial, definiram as Classes Imaturo, Em maturação, Maduro e Esgotado, para esta mesma espécie.

Apesar das diferentes formas de classificação gonadal presentes na literatura, recentemente, as Classes reprodutivas presentes no ciclo reprodutivo dos machos de uma espécie têm sido associadas aos estágios de desenvolvimento das células germinativas presentes nos testículos e às alterações anuais do epitélio germinativo, de contínuo (caracterizado por uma população contínua de células de Sertoli e células germinativas) a descontínuo (no qual ocorre a perda das células germinativas quando os espermatozóides são liberados para a luz lobular ou tubular) (GRIER & TAYLOR, 1998; GRIER, 2002). Esta metodologia tem sido amplamente difundida e mostrou ser viável para diferentes grupos de

peixes, como *Cynoscion nebulosus*, *Rachycentron canadum*, *Padogobius martensi*, *Synbranchus marmoratus*, *Sorubim lima*, *Salminus maxillosus* = *brasiliensis*, *Pseudoplatystoma fasciatum* = *reticulatum* e *Gymnotus carapo*, espécies pertencentes às Ordens Perciformes, Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes (BROWN-PETERSON & WARREN, 2001; BROWN-PETERSON *et al.*, 2002; CINQUENTTI & DRAMIS, 2003; LO NOSTRO *et al.*, 2003a; NÓBREGA, 2003, VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003, BATLOUNI *et al.*, 2006 e ISHIBA *et al.*, 2010).

Deste modo, este trabalho teve por objetivo definir as classes de maturação gonadal e caracterizar o ciclo reprodutivo anual do tucunaré amarelo *C. kelberi*, com base nas alterações do epitélio germinativo testicular, associado aos estágios das células germinativas presentes, mais as análises macroscópicas dos testículos.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de março de 2009 a fevereiro de 2010, 77 exemplares machos e adultos e um exemplar imaturo, do tucunaré amarelo *Cichla kelberi* foram coletados mensalmente, com o auxílio de vara de pesca e anzol (carretilha e molinete) (Fig. 1). As coletas foram realizadas na Lagoa do Pernilongo (20° 29' 11,93"S, 51° 25' 33,27"O) e Ilha da Ferradura (20° 28' 27,11" S, 51° 25' 54,53"O), ambos localizados no Reservatório de Jupia, rio Paraná, situado no município de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil (Figs. 2 e 3). Depois de anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (0,5g de benzocaína em 5mL de álcool absoluto e 5L de água), foi realizada a mensuração do comprimento total (LT, cm), padrão (LS, cm) e peso total (W, g) de cada exemplar.

Para as análises macroscópicas dos testículos, foram observadas a consistência, a coloração, o diâmetro e a vascularização das gônadas.



Figura 1: Exemplar de macho adulto de *Cichla kelberi*. (Lt = 35,5 cm).



Figura 2: Imagem de satélite dos pontos de coleta no Reservatório de Jupiá. (Fonte: Google Earth).



Figura 3: Imagens dos pontos de coleta: **A** e **B** – Ilha da Feradura; **C** e **D** – Lagoa do Pernilongo.

1. Processamento para microscopia óptica

Os testículos foram removidos e seccionados transversal e longitudinalmente em sua região intermediária e fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen, pH 7,4, na qual permaneceram por um período mínimo de 24 horas. Em seguida, foram desidratados em solução alcoólica, em série crescente de concentração e embebidos em glicol metacrilato (Technovit 7100/historesina), seccionados a 3,0 μm de espessura em micrótomo equipado com navalha de vidro LEICA RM 2245 e corados com Hematoxilina e Eosina, Azul de Toluidina, além de serem submetidos à reação de Reticulina.

Todo o material assim preparado foi analisado ao Microscópio óptico Olympus – CX 41 e fotografado com maquina fotográfica MOTICAM 2500 – 5.0 MPixel USB 2.0.

2. Processamento para histoquímica

Os testículos foram removidos e seccionados transversal e longitudinalmente em sua região intermediária e fixados em solução de Bouin, na qual permaneceram por um período máximo de 24 horas. Após este período realizou-se trocas sucessivas com álcool 70% até a retirada de todo o excesso de fixador. Em seguida foram desidratados em solução alcoólica em série crescente de concentração e embebidos em “paraplast” (Paraplast Plus – McCormick ref. 502004).

Para a confecção das lâminas histológicas, o material biológico já incluído foi submetido a cortes de 5 µm de espessura, obtidos em um micrótomo equipado com navalha de aço LEICA RM 2145. Os cortes foram selecionados e toda a rotina de histoquímica para reações em PAS (Ácido Periódico-Schiff), AB (Alcian blue) pH 0,5 e 2,5, Metacromasia (Azul de Toluidina pH 2,5 e 5,6) se desenvolveu no Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos da Faculdade de Ciências da UNESP, Campus de Bauru.

3. Crescimento gonadal

Para analisar o crescimento dorsoventral e lateral dos testículos de *C. kelberi* durante seu desenvolvimento no período reprodutivo, os Índices de altura e largura dos testículos de 10 indivíduos de cada classe de maturação foram calculados a partir da seguinte relação:

$$\text{Índice de altura ou largura} = \frac{\text{altura ou largura do testículo} \times 100}{\text{Comprimento padrão}}$$

A altura dos testículos foi calculada a partir do ducto testicular principal até a periferia do testículo, enquanto a largura foi medida de uma extremidade lateral a outra. As medidas foram feitas em µm e transformadas em mm (Fig. 4).

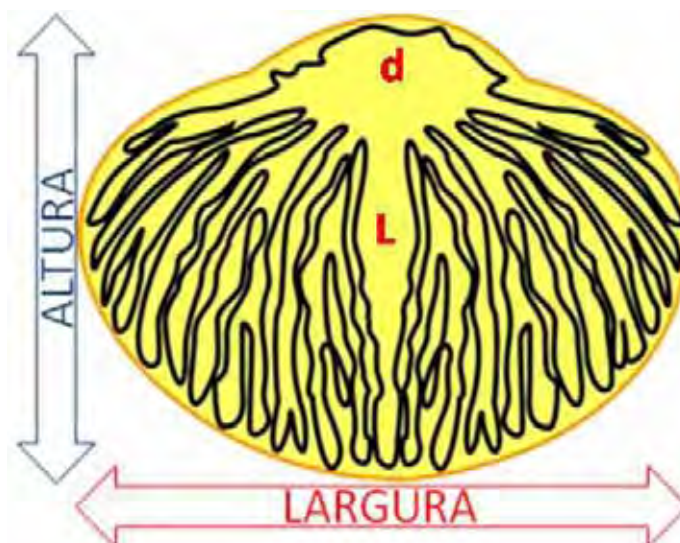


Figura 4: Esquema de medidas do crescimento dorsoventral (altura) e lateral (largura) para os cálculos de Índice de altura e largura dos testículos de *C. kelberi*. **d** = ducto testicular principal; **L** = lóbulos.

RESULTADOS

1. Características morfométricas de *Cichla kelberi*

Os exemplares do tucunaré amarelo *C. kelberi*, apresentaram comprimento total entre 21,0 e 43,0cm (média de 32,9cm; desvio padrão de 4,8), comprimento padrão entre 18,0 e 35,5cm (média de 27,3cm; desvio padrão de 4,4) e peso variando entre 100g e 1180g (média de 486,8g; desvio padrão de 236,6).

2. Estrutura testicular de *Cichla Kelberi*

Em *C. kelberi* os testículos são órgãos pares alongados, localizados dorsalmente à cavidade celomática abaixo dos rins. Apesar de individualizados por quase toda sua extensão, se unem caudalmente, associando-se a uma glândula acessória (Figs. 5, 13A e B). São revestidos por um mesotélio e internamente envoltos por uma túnica albugínea que emite projeções para o interior dos testículos formando os lóbulos (Figs. 6, 13C e D). Estes lóbulos terminam em fundo cego na periferia testicular (região distal e dorsal), e se orientam em direção à região ventral do testículo (região proximal), onde se bifurcam, formando uma

região de estocagem, chamada região anastomosada (Figs. 6, 13C-E). A região anastomosada se abre em uma área de estocagem e condução de espermatozóides para o ducto espermático, chamada ducto testicular principal (Figs. 6, 13E e F). O ducto espermático de cada testículo se funde, formando um pequeno e único órgão, antes de abrir em uma papila urogenital (Fig. 5).

No interior dos lóbulos, forma-se um epitélio germinativo constituído por células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (espermatogônias primárias, espermatogônias secundárias, espermátócitos primários, espermátócitos secundários e espermátides) (Fig. 14). Neste epitélio, enquanto espermatogônias primárias são observadas individualmente ao longo de toda a extensão dos lóbulos ou formando os agrupamentos espermatogoniais (“clusters” ou “ninhos” espermatogoniais periféricos) na periferia testicular, as demais células germinativas são confinadas em cistos ou espermatocistos, formados por projeções citoplasmáticas das células de Sertoli (Figs. 6, 7 e 14). Apesar da ocorrência de um pequeno assincronismo entre os espermátócitos primários no início da primeira divisão meiótica (Fig. 14E), o desenvolvimento das células germinativas no interior de cada cisto ocorre de forma sincrônica, e culmina com a liberação de espermatozóides para a luz lobular, ao final da espermiogênese (Figs. 7, 14C-F).

As análises macroscópicas, associadas às alterações sofridas pelo epitélio germinativo, de contínuo a descontínuo, em conjunto ao estágio de desenvolvimento das células germinativas presentes durante o ciclo reprodutivo do *C. kelberi*, permitiram a definição de 4 classes de maturação gonadal ao longo do ano:

I - Maturação Inicial

Nesta etapa, os testículos são filiformes, com um diâmetro reduzido, pouca vascularização sanguínea e são translúcidos (Fig. 15A).

Histologicamente, a Classe de Maturação Inicial caracteriza-se por apresentar um epitélio germinativo totalmente contínuo, que se estende desde a periferia até a região do ducto testicular principal, que nesta fase é filiforme, pouco visível e apresenta luz reduzida (Fig.15B-E). Os lóbulos estão completamente tomados por espermatocistos contendo células germinativas (espermatogônias secundárias, espermátócitos primários e secundários e espermátides), que se dividem ativamente por processos mitóticos e meióticos no decorrer da espermatogênese (Fig. 15D e F). Os cistos de espermátócitos primários são os mais frequentes e as espermatogônias primárias raramente são observadas entre eles (Fig.15D e F). O lúmen

lobular, inicialmente imperceptível à microscopia óptica, torna-se visível à medida que o desenvolvimento prossegue e os cistos espermatogênicos se rompem, liberando os espermatozóides para a luz (Fig. 15G). Mesmo com o rompimento de alguns espermatocistos, o epitélio germinativo se mantém contínuo nesta etapa do ciclo reprodutivo (Figs. 8 e 15G). Os “clusters” periféricos, formados por espermatogônias, são observados em número reduzido e com poucas células em seu interior (Fig. 15H).

Mensalmente *C. kelberi* apresentou mais de uma classe reprodutiva testicular ao longo do período de coleta. Todavia, em todo o período amostral, somente onze exemplares estavam em Maturação Inicial, e apesar de sua ocorrência ao longo de todo o ano, indivíduos nesta classe de maturação gonadal foram encontrados, principalmente, entre os meses de março e abril de 2009 (Fig. 9).

II - Maturação Intermediária

Nesta etapa os testículos sofrem aumento tanto de sua vascularização sanguínea quanto de seu volume, chegando próximo ao volume máximo observado para os testículos de *C. kelberi* (Fig. 16A).

Histologicamente, a Classe de Maturação Intermediária tem início com o surgimento de um epitélio germinativo descontínuo na região anastomosada (Fig. 16B). Com o progresso do desenvolvimento gonadal, a descontinuidade do epitélio germinativo é observada nos lóbulos próximos ao ducto testicular principal, permanecendo, entretanto, contínuo na periferia dos testículos (Fig. 16C e D). Com o avanço da Classe de Maturação Intermediária e conseqüente rompimento dos cistos espermatogênicos, observa-se na luz lobular um aumento do volume de espermatozóides (Fig. 16E-G).

Neste período, a espermatogênese na região anastomosada torna-se cada vez mais reduzida, evidenciada pela presença de escassos cistos, e esta área, em conjunto com o ducto testicular principal, passa a atuar na estocagem de espermatozóides (Fig. 16E-G). Apesar da escassez de cistos na região próxima ao ducto testicular principal, na região distal os lóbulos continuam apresentando muito cistos, com células germinativas em plena espermatogênese. Semelhante ao observado na Classe de Maturação Inicial, espermatogônias primárias são escassas por toda a gônada, tornado-se ausentes os agrupamentos periféricos ou “clusters”, ao final desta classe de maturação (Fig. 16H).

Os exemplares do tucunaré amarelo que apresentaram testículos em Maturação Intermediária foram capturados, principalmente entre maio e junho de 2009, estando, entretanto, presentes ao longo de todos os meses do período amostral (Fig. 9).

III- Maturação Final

Nesta fase do desenvolvimento gonadal, os testículos de *C. kelberi* atingem o maior diâmetro entre as classes de maturação observadas, além de apresentar pouca vascularização sanguínea e uma coloração esbranquiçada (Fig. 17A).

Histologicamente, a Classe de Maturação Final em *C. kelberi* tem início quando a descontinuidade do epitélio germinativo atinge a região testicular periférica, o que não ocorre de forma simultânea para todos os lóbulos (Fig. 17D). Deste modo, no início desta Classe de maturação, muitos lóbulos ainda apresentam epitélio germinativo contínuo em sua porção distal. Contudo, à medida que o desenvolvimento gonadal avança, a descontinuidade progride até ser observada em todo o testículo.

Na Classe de Maturação Final, tanto a região anastomosada, na qual foi cessada a espermatogênese, quanto o ducto testicular principal, estocam um grande volume de espermatozóides (Fig. 17B e C). Mesmo com a ausência de divisões mitóticas e meióticas na região anastomosada e nos lóbulos situados próximos ao ducto testicular principal, e do grande volume de espermatozóides por toda a gônada, observa-se muitos cistos espermatogênicos em plena atividade, distribuídos ao longo de todo o epitélio germinativo da região lobular (Fig. 17F e G). Espermatogônias primárias estão dispersas por toda a gônada, assim como na periferia testicular, onde aparecem isoladamente entre os cistos ou formando os “clusters”, estes observados somente ao final desta classe de maturação (Fig. 17 E e H).

A Classe de Maturação Final foi a classe reprodutiva mais frequente durante todo o período amostral, com indivíduos presentes em todos os meses de coleta. Entretanto, o número de exemplares capturados foi maior entre os meses de maio e junho de 2009 e entre setembro de 2009 a fevereiro de 2010 (Fig. 9).

IV- Regressão

Nesta classe de maturação, os testículos apresentam volume bastante reduzido, textura flácida e grande vascularização sanguínea (Fig. 18A).

Histologicamente, a Classe de Regressão em *C. kelberi* pode ser reconhecida por múltiplas características, sendo algumas delas peculiares a esta classe reprodutiva. Entre elas podemos citar: número reduzido de espermatocistos, com alguns em pleno processo espermatogênico; inúmeras espermatogônias em proliferação ao longo de toda a gônada, principalmente nos “clusters” periféricos, muito numerosos nesta fase e; espermatozóides residuais dispersos por toda a extensão gonadal, além da presença de um epitélio germinativo totalmente descontínuo em todos os lóbulos, como observado na Maturação Final (Fig.18B-H).

Nesta classe de maturação o ducto testicular principal, assim como o restante da gônada (lóbulos e interstício), apresenta um contorno irregular e tortuoso. Por conta desta irregularidade, a distinção morfológica entre as regiões de lóbulo e anastomosada fica comprometida (Fig. 18C e D). Toda a gônada apresenta um mesmo aspecto histológico, com interstício bastante evidente, muitas espermatogônias primárias e inúmeras células de Sertoli, que auxiliam no processo de reestruturação gonadal, fagocitando os corpos residuais do ciclo reprodutivo anterior (Fig. 18B, E-G).

Durante esta Classe de maturação gonadal as espermatogônias primárias intensificam sua proliferação, repovoando a gônada através de sucessivas divisões mitóticas, que darão origem a novos cistos espermatogênicos (Fig. 18H). Ao final da Regressão os testículos estão completamente tomados por cistos de células germinativas e o animal pronto para entrar em um novo ciclo reprodutivo, retornando a Classe de Maturação Inicial (Fig. 11).

Indivíduos com testículos em Regressão também foram frequentes, sendo encontrados, principalmente, entre os meses de julho e agosto de 2009 (Fig. 9).

3. Crescimento testicular em *Cichla kelberi*

O crescimento testicular em *C. kelberi* faz parte de seu processo de maturação gonadal, sendo que o aumento dorsoventral e lateral do testículo, analisados pelos Índices de altura e largura, respectivamente, estão condicionados à classe de maturação que cada indivíduo se encontra dentro do ciclo reprodutivo. Este aumento ocorre de forma gradativa desde o momento em que o indivíduo ainda está imaturo, quando a gônada apresenta tamanho reduzido, à Maturação Final, quando o testículo atinge seu desenvolvimento máximo. A partir deste momento, no entanto, os testículos começam a sofrer redução de seu tamanho, até

atingir a Classe de Regressão, na qual apresentam seu menor comprimento dentre as classes de maturação gonadal. Entretanto, apesar de seu tamanho reduzido, os testículos em Regressão dos exemplares de *C. kelberi* capturados, ainda são maiores do que um imaturo (Fig. 10).

4. Análises histoquímicas

As características histoquímicas dos testículos de *C. kelberi* estão resumidas nas figuras 12 e 19. As fibras de colágeno estão presentes no tecido conjuntivo que forma os septos e dividem o compartimento germinativo em lóbulos. Elas reagiram de forma positiva à técnica de PAS, variando em intensidade conforme sua localização no testículo. Deste modo, elas foram fortemente PAS-positivas na túnica albugínea e moderadamente PAS-positivas no interstício e ducto testicular principal (Fig. 19B e C). A reação com PAS após digestão em amilase revelou a mesma intensidade de reação das regiões marcadas com a técnica de PAS indicando a ausência de glicogênio no testículo de *C. kelberi*.

Além da presença de glicosaminoglicanas neutras (fibras colágenas), a técnica de AB permitiu a identificação de mucosubstâncias ácidas nos testículos de *C. kelberi*. Quando em contato com AB pH 0,5 e 2,5, essas substâncias coraram-se em azul. Embora AB-positivas, as glicosaminoglinas ácidas apenas reagiram fracamente na túnica albugínea e túnica conjuntiva do ducto testicular principal (Fig. 19D e E). Para o conhecimento da natureza química das substâncias ácidas presentes nos testículos de *C. kelberi*, seria necessário a utilização de outra técnica, na qual se emprega Fucsina aldeída em conjunto com AB.

As análises das características histoquímicas da glândula anexa aos testículos de *C. kelberi*, também foram conduzidas (Figs. 12 e 19). Os resultados mostraram a presença de glicosaminoglicanas neutras, que reagiram positivamente ao PAS, embora em diferentes intensidades. Na túnica média da glândula, as substâncias neutras foram moderadamente-positivas ao PAS (Fig. 19F). Já no epitélio de revestimento, grânulos encontrados no citoplasma apical das células epiteliais reagiram fortemente ao PAS (Fig. 19F). Assim como nos testículos, não foi detectada a presença de glicogênio na glândula acessória de *C. kelberi*, através da digestão com amilase, seguida da técnica de PAS. Também foram identificadas glicosaminoglinas ácidas na glândula anexa de *C. kelberi*, reagindo positivamente apenas

com AB pH 2,5. Estas reações ocorreram com fraca intensidade nas células constituintes do epitélio de revestimento.

Na reação para identificação de conjugados, PAS + AB, ocorreram as mesmas reações das técnicas anteriores. No grupo de bloqueio para PAS (acetilação) e AB (metilação), as reações foram negativas tanto nos testículos como na glândula anexa. As reações de metacromasia, com a técnica de AT pH 2,5 e 5,6, não apresentaram resultados positivos (Fig. 12).

DISCUSSÃO

A caracterização morfológica dos testículos de *C. kelberi* como do tipo lobular (GRIER 1993) está filogeneticamente de acordo com os resultados de Parenti & Grier, (2004) que propõem a presença de testículos lobulares em todos os Neoteleósteos sobreviventes, a exemplo dos Perciformes *Centropomus undecimalis* (GRIER & TAYLOR, 1998), *Cichla intermedia* (ANTONELI, 1999), *Rachycentron canadum* (BROWN-PETERSON *et al.*, 2002), *Padogobius martensi* (CINQUENTTI & DRAMIS, 2003), *Otolithes ruber* (DADZIE & ABOU-SEEDO, 2004), *Schindleria praematura* (THACKER & GRIER, 2005) *Cichla kelberi* (SOUZA, 2007), *Satanoperca pappaterra* e *Cichla kelberi* (MARTINS *et al.*, 2010), nos Scorpaeniformes *Aspitrigla obscura* (MUNÑOZ *et al.*, 2010) e *Tigra lyra* (MUNÑOZ *et al.*, 2002), além do Synbranchiformes *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO *et al.*, 2003b), em contrapartida aos táxons mais basais, como *Prochilodus scrofa* (VICENTINI *et al.*, 2001), *Salminus maxillosus = brasiliensis* (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003); *Brycon siebenthalae* (ARIAS *et al.*, 2004), *Pseudoplatystoma fasciatum = reticulatum* (BATLOUNI *et al.*, 2006), *Serrasalmus spilopleura* (NÓBREGA & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2007), *Scoloplax distolothix* (SPADELLA *et al.*, 2008), *Gymnotus carapo* (ISHIBA *et al.*, 2010), *Oligosarcus argenteus* (MATTA *et al.*, 2009) e *Danio rerio* (LEAL *et al.*, 2009), que apresentam testículos do tipo tubular anastomosado (GRIER, 1993).

A disposição das espermatogônias observadas nos testículos do tucunaré amarelo *C. kelberi*, o caracterizam como do tipo espermatogonial irrestrito (GRIER *et al.*, 1980; GRIER, 1981; GRIER, 1993; PUDNEY, 1995; GRIER & ARANZABAL, 2009). Este tipo de distribuição das espermatogônias ocorre na maioria dos táxons existentes, sendo encontrado tanto em espécies com testículos do tipo tubular anastomosado, como naquelas com testículos

do tipo lobular (GRIER & TAYLOR, 1998; VICENTINI *et al.*, 2001; BROWN-PETERSON *et al.*, 2002; MUÑOZ *et al.*, 2002; BROWN-PETERSON, 2003; CINQUENTTI & DRAMIS, 2003; LO NOSTRO *et al.*, 2003b; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003; ARIAS *et al.*, 2004; BATLOUNI *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2010), como observado em *C. Kelberi*. Entretanto, nas ordens Atheriniformes, Cyprinodontiformes e Beloniformes (PARENTI & GRIER, 2004), a exemplo do que ocorre em *Gambusia affinis* (FRAILE *et al.*, 1992), as espermatogônias são restritas a porção distal dos lóbulos, caracterizando os testículos dos representantes destas ordens como do tipo espermatogonial restrito (GRIER *et al.*, 1980). Portanto, até o momento a distribuição espermatogonial restrita é uma característica exclusiva do testículo do tipo lobular.

Apesar de classificado como espermatogonial irrestrito (GRIER *et al.*, 1980), o padrão de distribuição das espermatogônias observado nos testículos de *C. kelberi*, parece se encaixar melhor a um novo tipo de distribuição espermatogonial proposto por Schulz *et al.* (2010), pois além de estarem dispersas por todo o comprimento gonadal, como observado no tipo espermatogonial irrestrito, espermatogônias primárias são encontradas, preferencialmente, formando agrupamentos celulares na periferia testicular. Este tipo de distribuição espermatogonial também foi encontrado para o Perciformes *Oreochomis niloticus* (VILELA *et al.*, 2003), no Pleuronectiformes *Solea senegalensis* (GARCIA-LOPEZ *et al.*, 2005) e no Gardiformes, *Gadus morhua* (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Como em *C. kelberi*, a maioria das espécies de Teleósteos estudada apresenta túbulos seminíferos que esvaziam diretamente no ducto testicular principal, e semelhante ao que ocorre em todas as espécies de peixe (LANHSTEINER & PATZNER, 2009), o ducto testicular principal de cada testículo de *C. kelberi* aumenta em diâmetro antes de continuar como ducto espermático. Estas duas estruturas são histologicamente similares, sendo considerados os locais da maturação final dos espermatozóides e de manutenção de sua viabilidade até a época reprodutiva (LANHSTEINER *et al.*, 1994; LANHSTEINER, 2003; LANHSTEINER *et al.*, 2003b).

O tipo de desenvolvimento das células germinativas descrito em *C. kelberi*, é denominado espermatogênese cística, sendo o mais comum entre os anamniotas (peixes e anfíbios), diferindo do que ocorre para os demais vertebrados (amniotas) que inclui répteis, aves e mamíferos, onde a espermatogênese é do tipo não-cística (NOBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). Apesar destes dois tipos serem os mais comumente descritos na literatura, e o tipo cístico ser praticamente uma unanimidade quando se fala de

espermato gênese em peixes, um outro tipo, denominado semi-cístico, ocorre em algumas poucas espécies, a exemplo do Characiformes *Bryconops affinis* (ANDRADE *et al.*, 2001), no Scorpaeniformes *Scorpaena notata* (MUÑOZ *et al.*, 2002) e no Siluriformes *Malapterurus electricus* (SHAHIN, 2006). Neste processo espermatogênético incomum, as células germinativas, espermátócitos e principalmente espermátides, não completam seu desenvolvimento no interior dos cistos, sendo liberados na luz lobular antes de atingirem o estágio de espermatozóide (LE GAC & LOIR, 1998; MUÑOZ *et al.*, 2002).

Apesar da maior parte dos autores descreverem o desenvolvimento das células germinativas dentro de um mesmo cisto, como um evento totalmente sincrônico ao longo de toda espermatogênese, como em *C. kelberi*, em *Fundulus heteroclitus* (SELMAN & WALLACE, 1986), *Cichla intermedia* (ANTONELI, 1999), *Sorubim lima* (QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999) e *Hoplias malabaricus* (NEGRÃO, 1999), uma pequena assincronia foi observada entre os espermátócitos primários de um mesmo cisto, durante a primeira divisão meiótica.

As Classes de maturação gonadal encontradas em *C. kelberi*, com exceção da Classe Regredida, são similares as Classes reprodutivas (Maturação Inicial, Maturação Intermediária, Maturação Final, Regressão e Regredida), inicialmente utilizadas por Grier & Taylor (1998), para definição do ciclo reprodutivo anual do robalo *Centropomus undecimalis*. Estas Classes reprodutivas, minuciosamente descritas por Grier (2002), foram definidas com base nas alterações histológicas do epitélio germinativo, associadas aos estágios de desenvolvimento das células espermatogênicas. Seguindo esta metodologia, o epitélio germinativo testicular é considerado contínuo, quando uma população de células de Sertoli e células germinativas estão associadas, ou descontínuo, no qual ocorre a perda das células germinativas quando os espermatozoides são liberados para a luz lobular ou tubular (GRIER & TAYLOR, 1998; GRIER, 2002). Entretanto, em *C. kelberi*, a continuidade do epitélio germinativo é mantida, mesmo havendo espermição de alguns cistos espermatogênicos, nas etapas iniciais do desenvolvimento gonadal. Esta manutenção da continuidade do epitélio germinativo, apesar do rompimento de alguns espermatozoides, se deve a sobreposição dos cistos das células germinativas, formando um epitélio germinativo em camadas. Deste modo, apesar da espermição dos cistos espermatogênicos superiores, a presença de cistos mais basais garantem a manutenção do epitélio germinativo na Classe de Maturação Inicial nos testículos do tucunaré amarelo *C. kelberi*.

Com base na metodologia proposta por Grier & Taylor (1998) e adotada no presente trabalho, Brown-Peterson & Warren (2001), Brown-Peterson *et al.* (2002), Cinquentti & Dramis (2003), Nóbrega (2003), Lo Nostro *et al.* (2003b) e Ishiba *et al.* (2010) também descreveram estas mesmas classes de maturação gonadal em *Cynoscion nebulosus*, *Rachycentron canadum*, *Padogobius martensi*, *Sorubim lima*, *Synbranchus marmoratus* e em *Gymnotus carapo*, respectivamente. Estes resultados indicam que a classificação gonadal baseada nesta proposta, provavelmente, se aplicaria a uma grande variedade de peixes (CINQUENTI & DRAMIS, 2003; BATLOUNI *et al.*, 2006).

Entretanto, em *C. kelberi*, assim como em *Pseudoplatystoma fasciatum* (BATLOUNI *et al.*, 2006), a Classe Regredida, caracterizada somente pela presença de espermatogônias (primárias ou secundárias) no epitélio germinativo (GRIER, 2002), não foi observada nos exemplares coletados. Esta classe de maturação gonadal, que denominamos por Classe Preparatória (VERISSIMO-SILVEIRA, 2003), ocorre provavelmente, apenas no início do primeiro ciclo reprodutivo em *C. kelberi*, momento em que as espermatogônias presentes sofrem uma intensa proliferação mitótica, preparando as gônadas para o início de sua maturação. A ausência de indivíduos na Classe Preparatória, após o primeiro ciclo reprodutivo de *C. kelberi* no Reservatório de Jupia, deve estar relacionada ao modo de reprodução adotada pela espécie, pois ao final de cada período reprodutivo, durante a Classe de Regressão, as gônadas de *C. kelberi* sofrem uma intensa proliferação espermatogonial, dando origem a novas células germinativas e, conseqüentemente, espermatocistos que repovoam a gônada. Deste modo, a Classe de Regressão em *C. kelberi*, reúne em uma mesma fase, a reestruturação gonadal, caracterizada pela fagocitose de corpos residuais, e a proliferação espermatogonial, não havendo, portanto, o retorno à Classe Preparatória ou Regredida, para iniciar um novo ciclo reprodutivo. Assim, como descrito para *C. monoculus* (MAGALHÃES *et al.*, 1996) e *C. piquiti* (VIEIRA *et al.*, 2009), não há em *C. kelberi*, indivíduos totalmente esgotados.

A atividade reprodutiva de *C. kelberi* no Reservatório de Jupia em Ilha Solteira, São Paulo, se assemelhou aos resultados obtidos por Gomieiro e Braga (2004) para *C. monoculus* = *kelberi* e Souza *et al.* (2008), para a mesma espécie de *Cichla*, introduzida em locais distintos da região Neotropical. Apesar de apresentar atividade reprodutiva ao longo de todo o ano, o tucunaré amarelo *C. kelberi* atinge seu pico reprodutivo no início da estação da primavera se estendendo pelo verão, quando as temperaturas são mais altas e as chuvas mais frequentes. Entretanto, Normando *et al.* (2009) e Gomieiro *et al.* (2009) descreveram uma

tática reprodutiva diferente, adotada pelos indivíduos de *C. kelberi* introduzidos no Reservatório de Três Marias, Minas Gerais e, em um lago artificial na cidade de Leme, no Sudeste do Brasil. Nestes locais, o *C. kelberi* apresentou pico reprodutivo em época de baixas temperaturas e anterior às estações de chuvas. Estes resultados demonstram a grande plasticidade fisiológica desta espécie, que permite mudanças em sua tática reprodutiva de acordo com o ambiente no qual se encontra. Possivelmente deste modo, esta espécie de tucunaré garante seu sucesso reprodutivo em ambientes distintos, podendo ser encontrada em diversas regiões do país, como relatado por Kelber (1999) e Kullander & Ferreira (2006).

Embora apresente um pico reprodutivo característico entre as estações da primavera e verão, foi verificado em *C. kelberi* outro pico de menor intensidade entre os meses de maio e junho de 2009, durante o outono. Tal acontecimento, também foi observado em todas as outras espécies de tucunaré descritas em literatura, embora em épocas distintas (MAGALHÃES *et al.*, 1996; CHELLAPA *et al.* 2003; GOMIEIRO & BRAGA, 2004; SPINOLA, 2005; MUÑOZ *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2009; GOMIEIRO *et al.*, 2009; NORMANDO *et al.*, 2009). Este tipo de reprodução, em que mais de um período reprodutivo ocorre ao longo do ano, parece ser uma característica comum aos representantes do gênero *Cichla*, sendo dessa forma denominados por Vazzoler (1996), como espécies que apresentam reprodução parcelada.

O Crescimento testicular observado em *C. kelberi*, assim como descrito por Grier & Taylor, (1998) para *Centropomus undecimalis*, faz parte do processo de crescimento gonadal. Ao final da Classe de Maturação Final e Regressão, as espermatogônias contidas nos “clusters” periféricos nos lóbulos testiculares em *C. kelberi*, iniciam a recomposição do epitélio germinativo, desempenhando um papel crucial na elongação lobular durante as Classes de Regressão e Maturação Inicial, podendo ser a mais importante fonte de renovação de células germinativas entre as estações reprodutivas, assim como ocorre para *Centropomus undecimalis*, que apresenta “clusters” de espermatogônias em todas as fases de seu ciclo (GRIER & TAYLOR, 1998). Já Brown-Peterson *et al.* (2002), descreve um tecido epitelióide como responsável pela reestruturação gonadal em *Rachycentron canadum* e Grier *et al.* (1997) e Veríssimo-Silveira (2003) observam a presença de cordões espermatogoniais em *Sciaenops ocellatus* e *Salminus maxillosus*= *brasiliensis*, respectivamente, durante a retomada da espermatogênese.

Com relação a histoquímica, assim como observado em *C. kelberi*, Nobrega (2003) também identificou a presença de polissacarídeos neutros nos testículos do Siluriforme

Sorubim lima, por meio da reação de PAS, entretanto, diferentemente do presente trabalho, suas análises foram realizadas somente à nível celular. Segundo Junqueira & Carneiro (2006), esta reação positiva se deve a presença de colágeno na constituição do tecido estudado. A reação de metacromasia, definida como a capacidade de modificação do padrão de coloração quando o corante Azul de Toluidina se liga a radicais eletronegativos no tecido (NOBREGA, 2003), não foi observada nos testículos do tucunaré azul *C. piquiti* (Costa, 2010; dados não publicados), e do tucunaré amarelo *C. kelberi*, e tampouco na glândula anexa desta última espécie, no presente trabalho.

A presença de órgãos acessórios associados aos testículos dos teleósteos tem sido estudada, principalmente, em espécies de peixes da família Bleniidae (LAHNSTEINER & PATZNER, 1990; LAHNSTEINER *et al.*, 1993; RICHTARSKI & PATZNER, 2000). Segundo Lahnsteiner & Patzner (2009) estes órgãos têm funções específicas na formação do líquido seminal e na manutenção da viabilidade dos espermatozóides. Dentre eles, as glândulas acessórias, também conhecidas como “bolsas cegas”, descritas para 16 espécies de peixes Mediterrâneos da família Bleniidae, são órgãos pares associados ao ducto espermático (RICHTARSKI & PATZNER, 2000), diferindo, portanto, do que ocorre em *C. kelberi*, que apresenta uma única glândula. Segundo Lahnsteiner *et al.* (2003a) estas glândulas não armazenam espermatozóides durante a reprodução, como observado para o tucunaré amarelo no presente trabalho. Todavia, estudos futuros deverão ser conduzidos a fim de esclarecer a real função desta glândula em *C. kelberi*.

FIGURAS

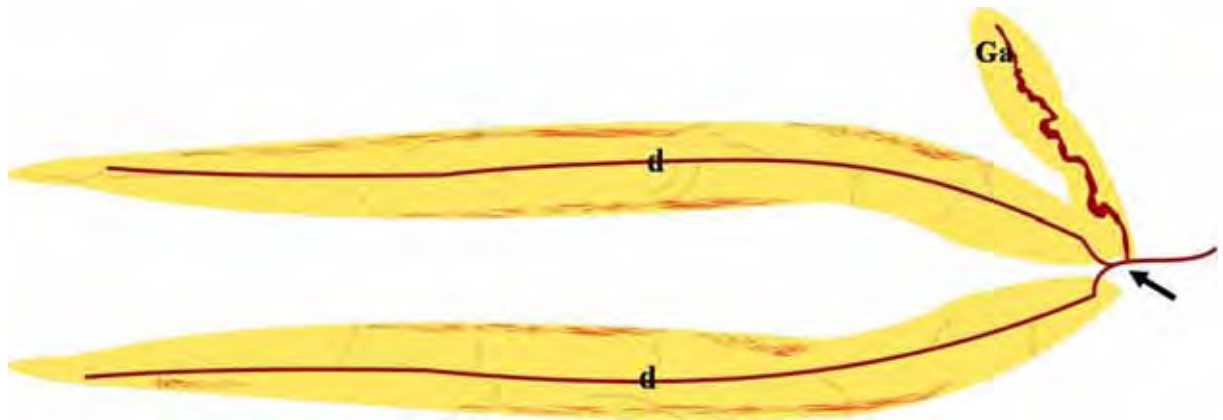


Figura 5: Esquema do testículo e Glândula anexa (Ga) de *C. kelberi*. **d** = Ducto testicular principal; Ducto espermático (→).

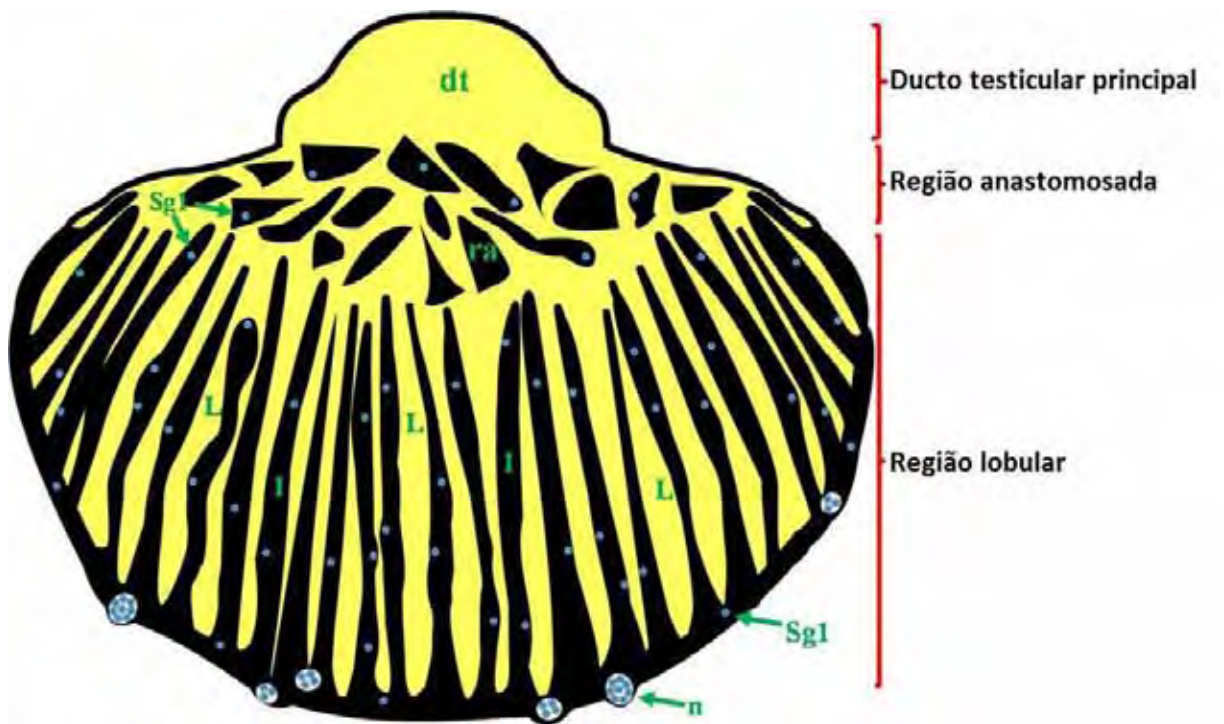


Figura 6: Esquema do testículo de *C. kelberi* em corte transversal. **d** = ducto testicular principal; **I**= interstício; **L** = lóbulos; **n** = “clusters” periféricos **ra** = região anastomosada; **Sg1** = Espermatogônias primárias

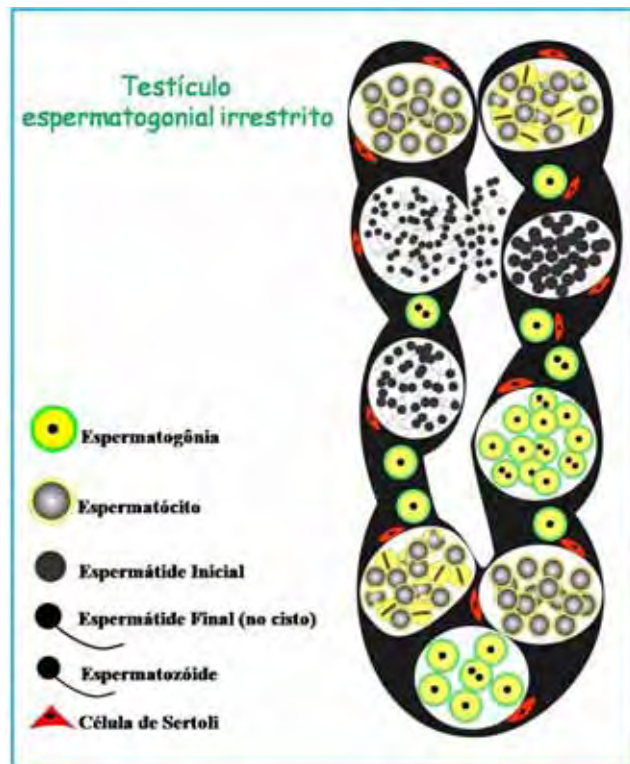


Figura 7: Esquema de testículo espermatogonial irrestrito.

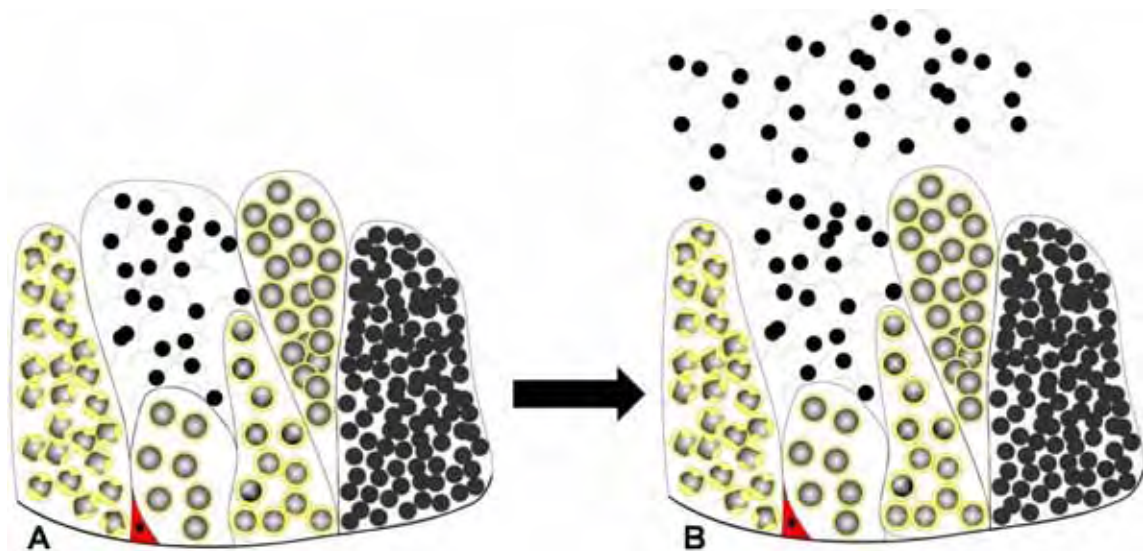


Figura 8: Esquema de maturação em estratos do testículo de *C. kelberi*. **A** = Epitélio germinativo sem cistos rompidos. **B** = Rompimento de um cisto superior e manutenção do epitélio germinativo contínuo.

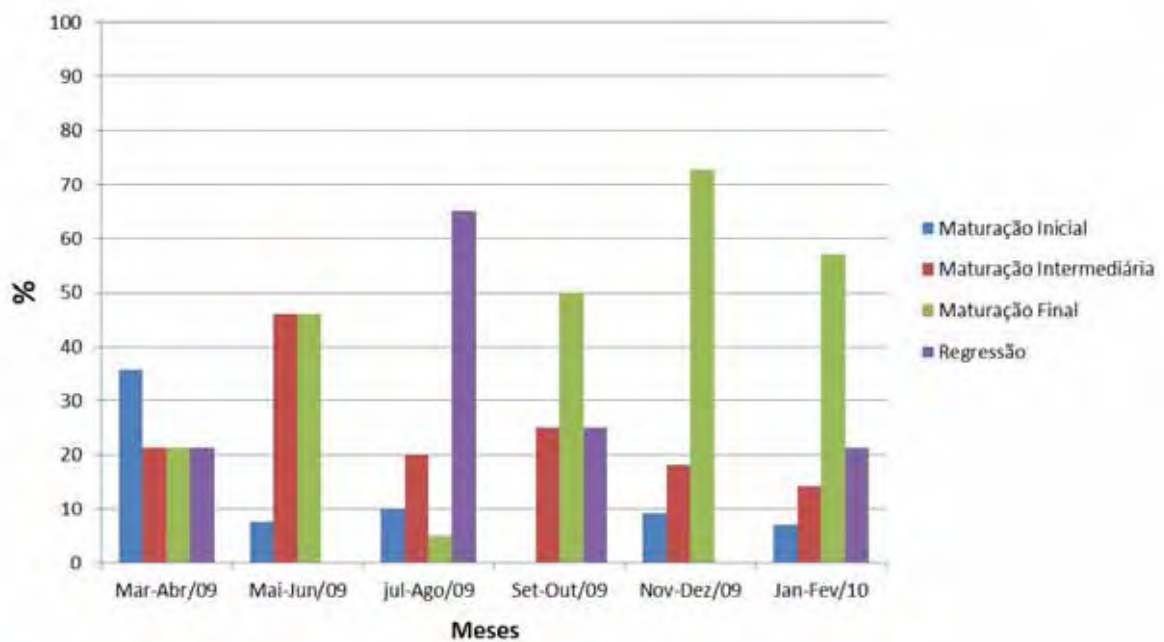


Figura 9: Gráfico do Ciclo reprodutivo anual do tucunaré amarelo *C. kelberi* (Dados bimestrais).

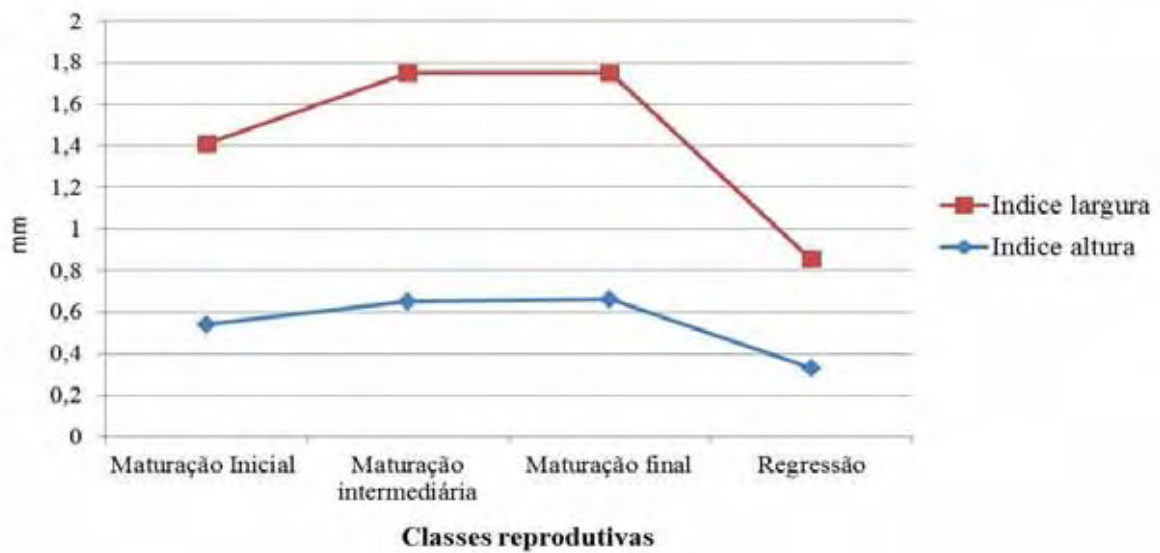


Figura 10: Índices testiculares de *C. kelberi*.

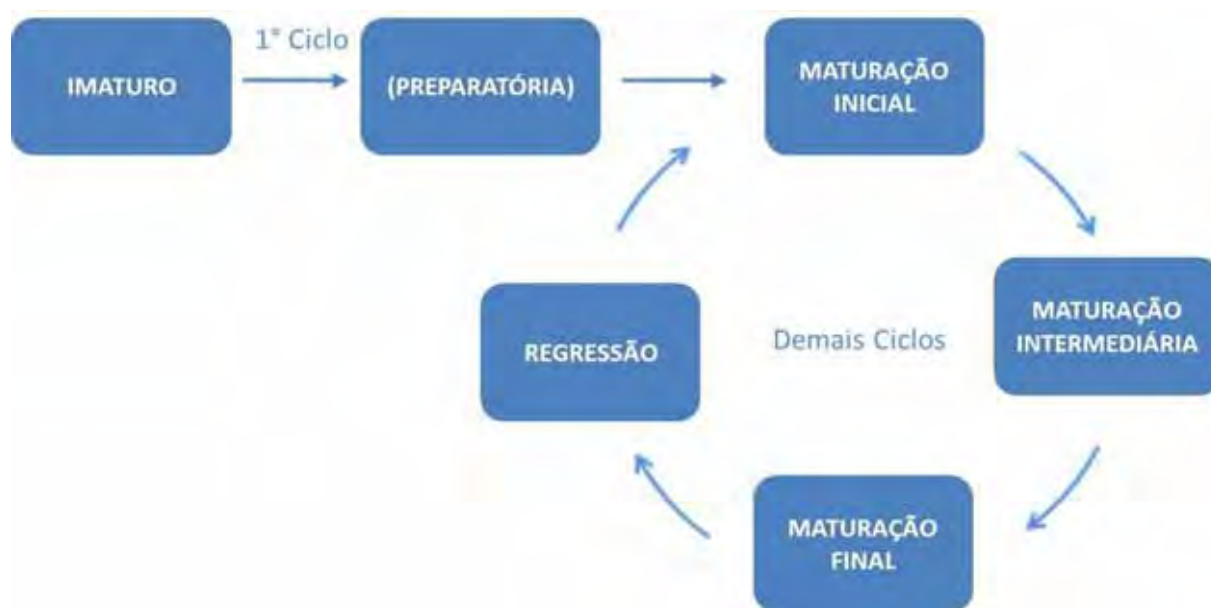


Figura 11: Dinâmica do Ciclo reprodutivo anual de *C. kelberi* (Adaptado de Costa, 2010; dados não publicados).

Regiões Reações	Testículo			Ducto testicular		Glândula anexa	
	Epitélio germinativo	Túnica albuginea	Interstício	Epitélio de revestimento	Túnica conjuntiva do ducto	Epitélio de revestimento	Túnica média
PAS	+	+++	++	–	++	+++ ¹	++
Amilase + PAS	+	+++	++	–	++	+++	++
Acetilação + PAS	–	–	–	–	–	–	–
AB pH 2,5	–	+	–	–	+	+	–
AB pH 0,5	–	–	–	–	–	–	–
PAS	+	+++	++	–	++	+++	++
+ AB (2,5)	–	+	–	–	+	+	–
Metilação + AB pH 2,5	–	–	–	–	–	–	–
AT pH 2,5	–	–	–	–	–	–	–
AT pH 5,6	–	–	–	–	–	–	–

Intensidade da reação: Forte (+++); Média (++); Fraca (+); Negativa (–)

1. Grânulos no citoplasma apical

Figura 12: Histoquímica de glicosaminoglicanas nos testículos e glândula anexa de *C. kelberi*.

FIGURA 13. Morfologia testicular de *Cichla kelberi*. **A e B:** Anatomia dos testículos de *C. kelberi*. Glândula acessória no detalhe. B,C a E: Reação de Reticulina; F: Coloração HE. **C e D:** Corte transversal da região periférica gonadal, mostrando a formação dos lóbulos testiculares. **E e F:** Corte transversal da região testicular proximal, mostrando a formação da região anastomosada (**ra**) e acima, do ducto testicular principal (**d**). **d** = ducto testicular principal, **L** = lóbulos testiculares, **ra** = região anastomosada, **ta** = túnica albugínea, **t** = Testículo, $\rightarrow$ = Glândula acessória, $\rightarrow$ = Septos intersticiais emitidos pela túnica albugínea para formação dos lóbulos, $\Rightarrow$ = lóbulos terminando em fundo cego na periferia testicular.

FIGURA 13

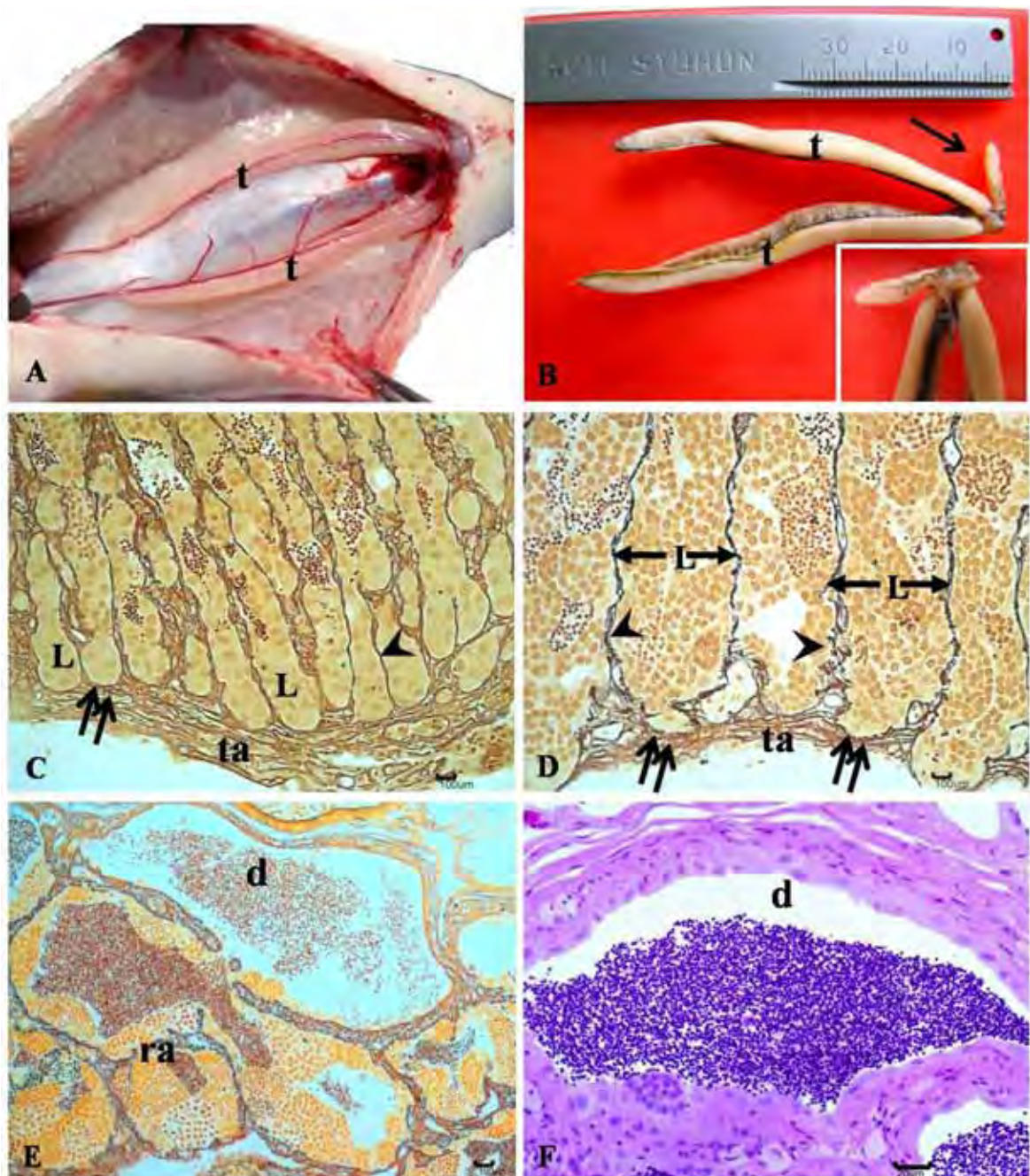


FIGURA 14. Espermatogênese em *Cichla kelberi*. Coloração HE. **A:** Distribuição espermatogonial. Espermatogônias primárias (**Sg1**) em meio a cistos de espermatócitos primários em Paquíteno (**Ec1**). **S** = Célula de Sertoli. **B:** “Cluster” periférico. n = “ninhos” (“cluster”) espermatogoniais periféricos. **C-F:** Processo espermatogênico ao longo da gônada. Em **D e E**, espermatócitos primários em Diplóteno (**Sc1**). Nos cistos podem ser observadas células germinativas em diferentes fases da primeira divisão meiótica, com destaque para a metáfase (**m**), que está bem evidente. **S** = Células de Sertoli, **Sg1** = Espermatogônia primária, **Sg2** = Cisto de espermatogônias secundárias, **Sc1** = Cisto de espermatócito primário, **St** = Cisto de espermátide, **Sz** = espermatozóides.

FIGURA 14

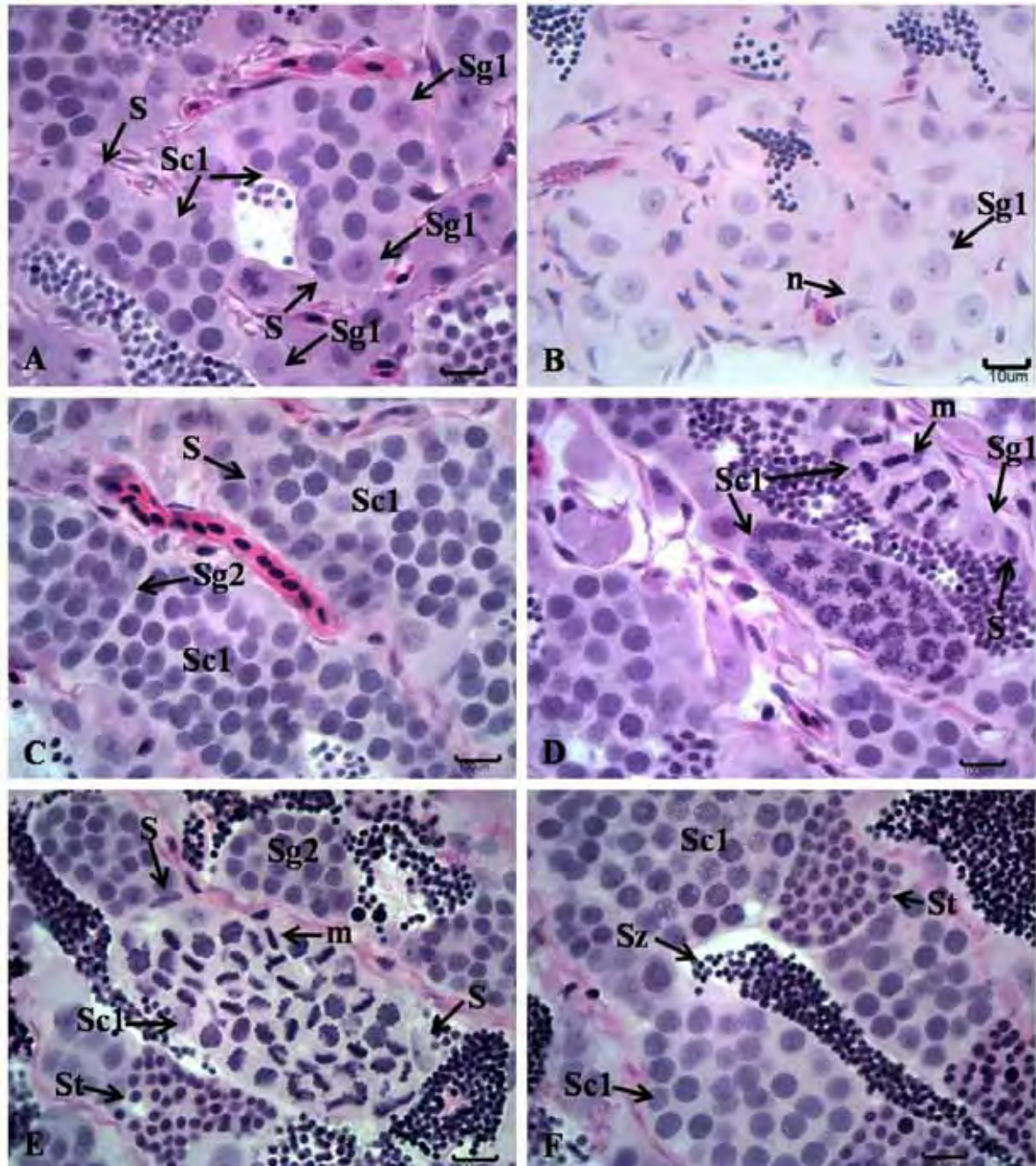


FIGURA 15: Características estruturais do estágio inicial de desenvolvimento gonadal, referente à Classe de Maturação Inicial em *Cichla kelberi*. **A:** Testículo de *C. kelberi* em Maturação Inicial B a H: Coloração HE. **B:** Detalhe de um testículo em Maturação inicial, com epitélio germinativo contínuo (**Egc**), na região lobular (**L**) e anastomosada (**ra**). **C:** Região lobular periférica, com epitélio germinativo totalmente contínuo (**Egc**). **D:** Lóbulos com epitélio germinativo contínuo (**Egc**) e cistos de células germinativas em diferentes fases da espermatogênese na região média da gônada. **E:** Região do ducto testicular principal (**d**), com destaque para estreita luz estreita (**→**). **F:** Cistos de células germinativas em diferentes fases da espermatogênese. **G:** Epitélio germinativo em camadas, com detalhe para cisto de espermatídes (**St**) em maturação em estrato superior, e cistos de espermatócitos (**Sc1**) em estrato mais basal. Assim, mesmo com a espermição do cisto superior, o epitélio germinativo se mantém contínuo, graças ao estrato basal de cistos. **H:** “Cluster” periférico de espermatogônias primárias (**n**). **d** = ducto testicular principal, **S** = Células de Sertoli, **Sg1** = espermatogônia primária, **Sg2** = espermatogônia secundária, **Sc1** = espermatócito primário, **St** = espermatíde, **t** = testículo, **⇒** fundo cego do lóbulo.

FIGURA 15

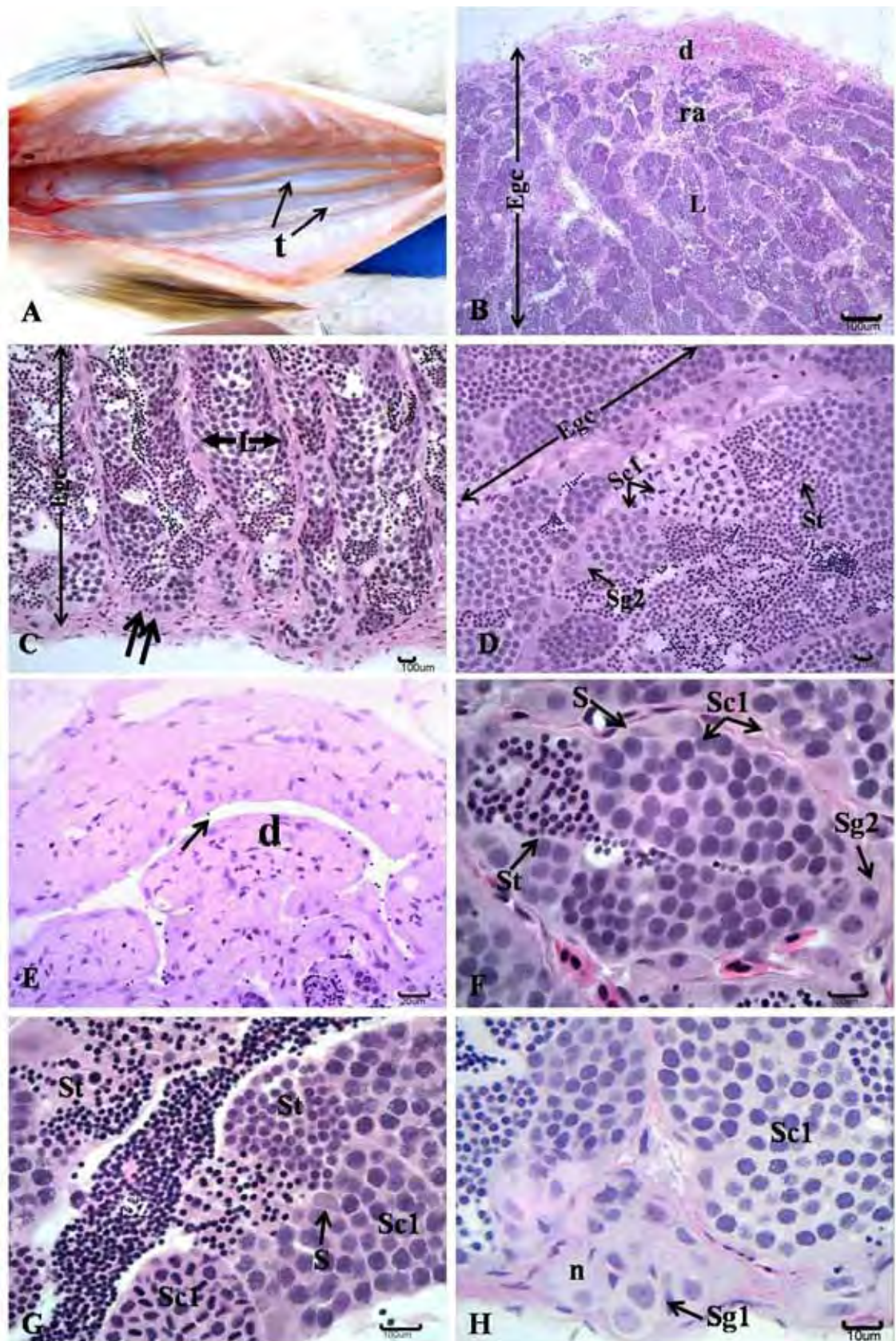


FIGURA 16. Características estruturais do estágio intermediário de desenvolvimento gonadal, referente à classe de Maturação Intermediária em *Cichla kelberi*. **A:** Testículo de *C. kelberi* em Maturação Intermediária. B-C, E-H: Coloração HE; D: Reação de Reticulina. **B:** Região proximal, com início de descontinuidade (*) na região anastomosada. **C:** Início da descontinuidade do epitélio germinativo (*), nos lóbulos próximos ao ducto testicular principal. **D:** Região periférica dos lóbulos, com epitélio germinativo contínuo (**Egc**) apesar do volume de espermatozóides na luz (**Sz**). **E:** Região anastomosada com espermatogênese diminuída, atuando na estocagem de espermatozóides. **F:** Ducto testicular principal estocando espermatozóides em sua luz, **G:** Descontinuidade do epitélio germinativo (*) na região média do testículo. **H:** “Cluster” periférico de espermatogônias primárias (**n**). **d** = ducto testicular principal, **I** = interstício, **S** = Células de Sertoli, **Sg1** = espermatogônia primária, **Sg2** = espermatogônia secundária, **Sc1** = espermatócito primário, **St** = espermátide, **Sz** = espermatozóides, **t** = testículo, $\Rightarrow$ fundo cego do lóbulo, * = descontinuidade do epitélio germinativo.

FIGURA 16

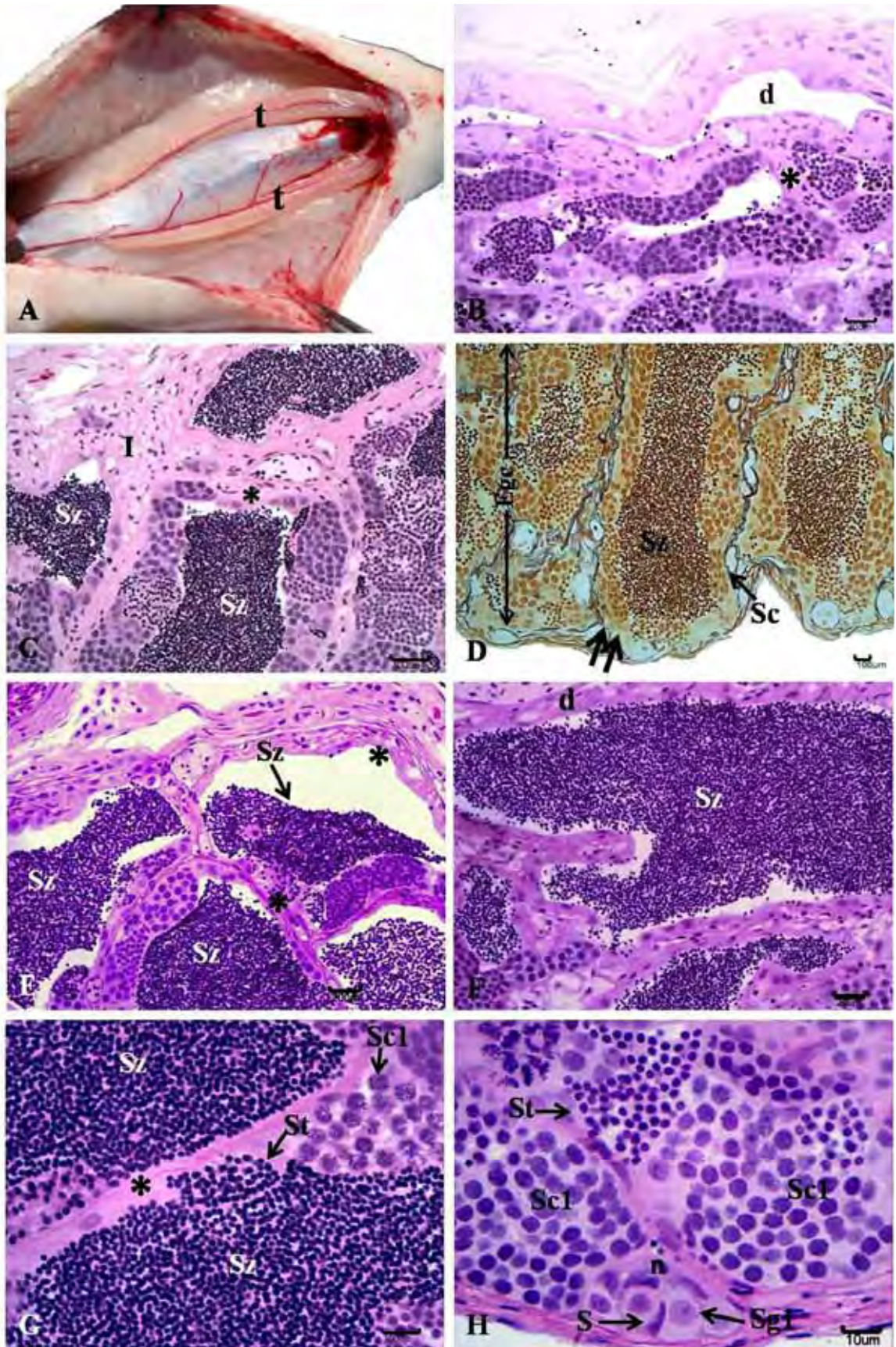


FIGURA 17. Características estruturais do estágio final de desenvolvimento gonadal, referente à classe de Maturação Final em *Cichla kelberi*. **A:** Testículo de *C. kelberi* em Maturação Final. Coloração HE. **B:** Corte longitudinal do ducto testicular principal, que estoca um grande volume de espermatozóides em sua luz (**Sz**), **C:** Região anastomosada com espermatogênese cessada, estocando espermatozóides. **D:** Região periférica dos lóbulos, com início de descontinuidade no epitélio germinativo (*). **E:** Região média da gônada com lóbulos repletos de espermatozóides (**Sz**) e grande descontinuidade do epitélio germinativo, **F e G:** Região média do testículo mostrando a presença de cistos em plena espermatogênese, apesar do grande volume de espermatozóides que toma a gônada. **H:** “Cluster” periférico de espermatogônias primárias (**n**). **d** = ducto testicular principal, **Egd** = epitélio germinativo descontínuo, **I** = interstício, **S** = Células de Sertoli, **Sg1** = espermatogônia primária, **Sg2** = espermatogônia secundária, **Sc1** = espermatócito primário, **St** = espermátide, **Sz** = espermatozóides, **t** = testículo, * = descontinuidade do epitélio germinativo.

FIGURA 17

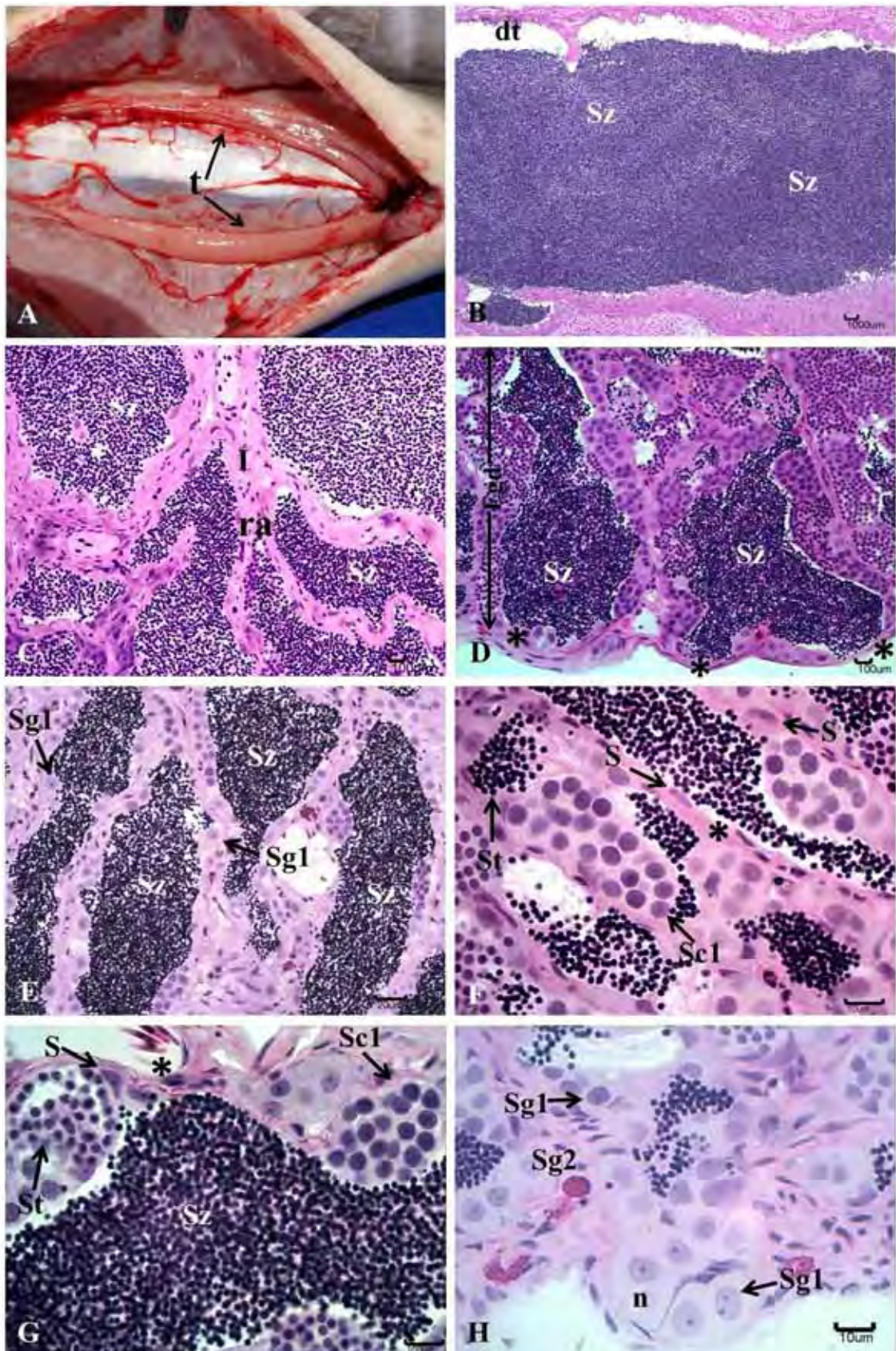


FIGURA 18. Características estruturais da Classe de Regressão em *Cichla kelberi*. **A:** Testículo de *C. kelberi* em Regressão. Coloração HE. **B:** Corte transversal do testículo em Regressão, evidenciando descontinuidade em todo o epitélio germinativo. **C e D:** Corte transversal da região proximal do testículo, mostrando a dificuldade de distinção entre ducto testicular principal (**d**), região anastomosada e lóbulos. **E e F:** Região média da gônada, mostrando um interstício (**I**) bastante evidente e um grande volume de espermatozóides residuais (**Er**) dispersos. **G:** Corte transversal de uma gônada em processo de reestruturação, com detalhe para célula de Sertoli fagocitando uma célula residual. **H:** “Cluster” periférico de espermatogônias primárias (**n**). **d** = ducto testicular principal, **Egd** = epitélio germinativo descontínuo, **Er** = espermatozóides residuais, **I** = interstício, **l** = luz lobular, **Sf** = Células de Sertoli em fagocitose, **Sg1** = espermatogônia primária, **Sg2** = espermatogônia secundária, **Sc1** = espermatócito primário, **t** = testículo.

FIGURA 18

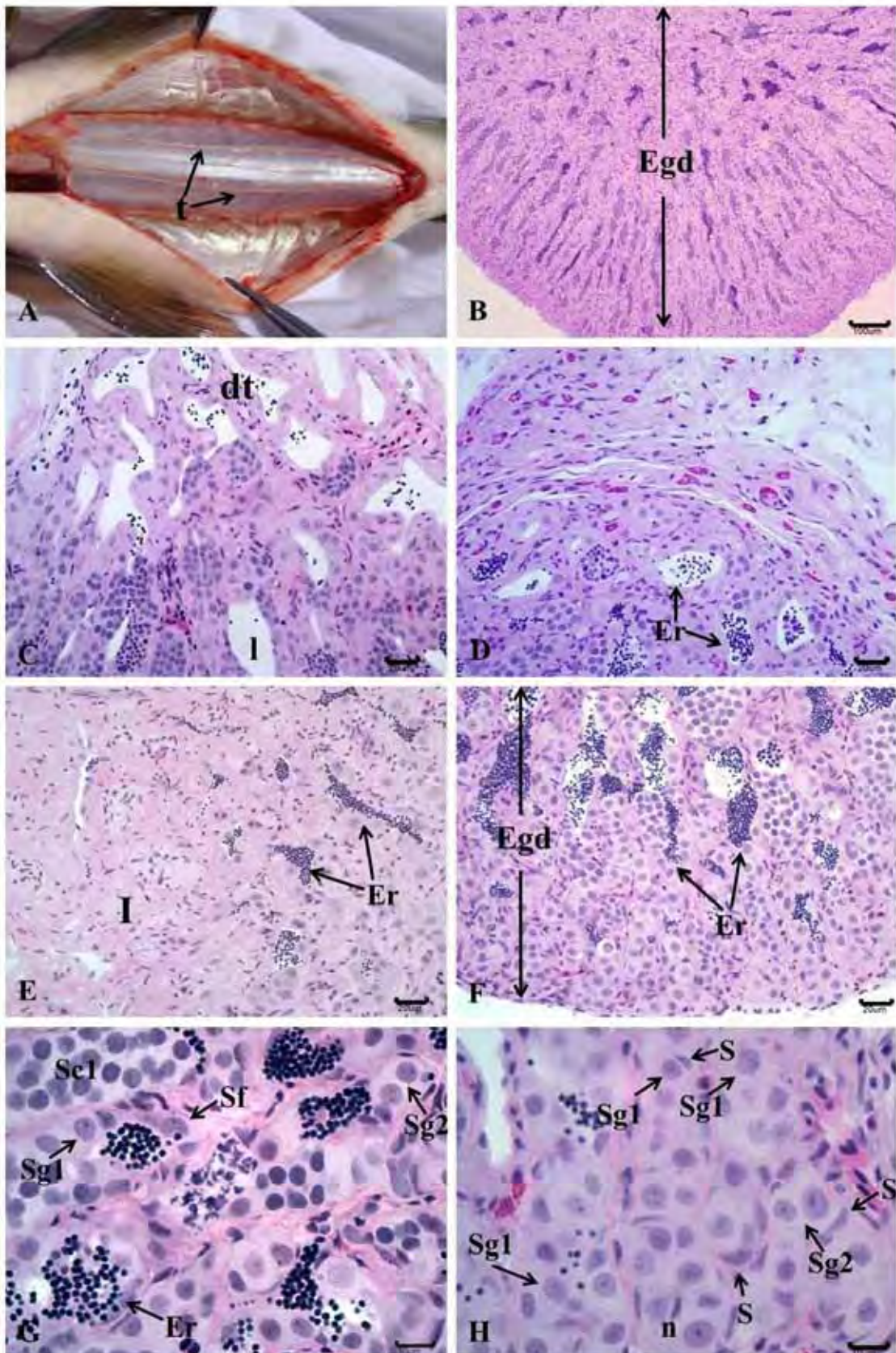
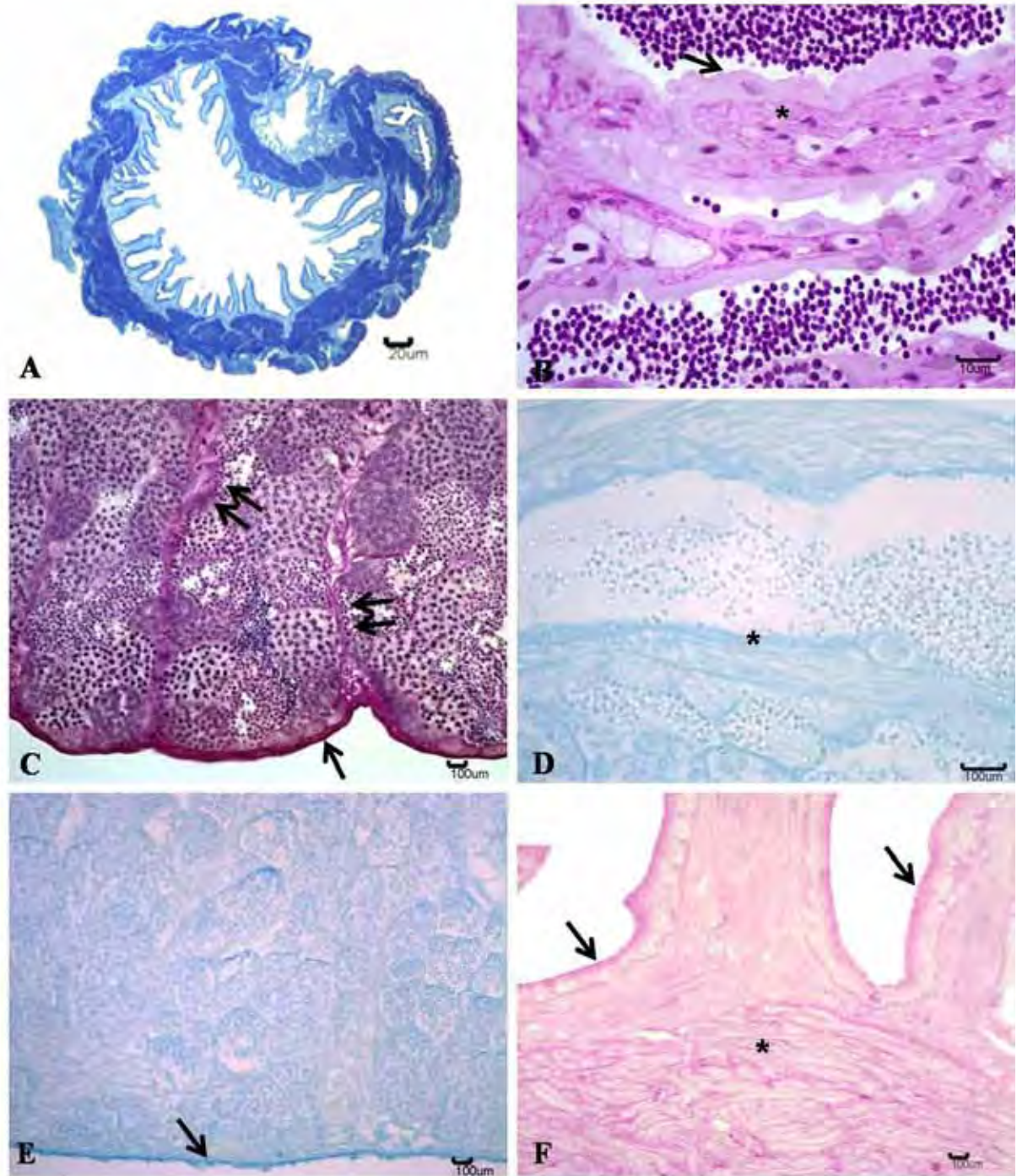


FIGURA 19. Análise histoquímica dos testículos e glândula anexa de *Cichla kelberi*. A: Coloração Azul de Toluidina; B, C e F: Reação de PAS; D e E: Reação de Alcian Blue. **A:** Corte transversal da glândula anexa. **B e D:** Região do ducto testicular principal. * = Túnica conjuntiva; → Epitélio de revestimento. **C e E:** Corte transversal da região testicular periférica. → túnica albugínea; ⇨ interstício. **F:** Detalhe da glândula anexa. → Células epiteliais de revestimento; * = Túnica média.

FIGURA 19



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. F. L.; KRISTOFFERSEN, C.; TARANGER, G. L.; SCHULZ, W. Spermatogenesis in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): A Novel Model of Cystic Germ Cell Development. **Biology of Reproduction**. v. 78, p. 27-34, 2008.
- ANDRADE, R. F.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. SATO, Y. Continuous gametogenesis in the Neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces:Characidae). **Tissue & Cell**. v. 33, n. 5, p. 524-532, 2001.
- ANTONELLI, F. N. **Aspectos Ultraestruturais da Espermatogênese no Tucunaré, *Cichla intermedia*, do Reservatório de Volta Grande (Rio Grande, MG)**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Botucatu. 1999.
- ARIAS, J. C.; ZANIBONI-FILHO, E.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Ciclo testicular del Yamú, *Brycon siebenthalae* (TELEOSTEI: CHARACIDADE) en cautiverio. **Actual Biol**. v. 26, n. 81, p. 185-195, 2004.
- BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive Cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei: Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium an approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**. v. 96, p. 116-132, 2006.
- BROWN-PETERSON, N. J.; WARREN, J. W. The Reproductive Biology of the Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus*, Along the Mississip Gulf Coast. **Gulf of Mexico Science**. v. 1, p. 61-73, 2001.
- BROWN-PETERSON, N. J; GRIER H. J.; OVERSTREET, R. M. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. **Journal of Fish Biology**. v. 60 p. 178-202, 2002.
- BROWN-PETERSON, N. J. The reproductive biology of spotted seatrout. In: Bortone, S. **Biology of the spotted seatrout**. 2003. p. 99–134.

CHELLAPPA, S.; CÂMARA, M. R.; CHELLAPPA, N. T.; BEVERIDGE, M. C. M.; HUNTINGFORD, F. A. Reproductive ecology of a Neotropical cichlid fish, *Cichla monoculus* (Osteichthyes: Cichlidae). **Brazilian Journal Biology**. v. 63, n. 1, p. 17-26, 2003.

CINQUETTI, R.; DRAMIS, L. Histological, histochemical, enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* between annual breeding seasons. **Journal of Fish Biology**. v. 63, p. 1402-1428, 2003.

DADZIE, S.; ABOU-SEEDO, F. Testicular structure and spawning cycle in the silvery croaker, *Otolithes ruber* (Perciformes: Sciaenidae) in the Kuwaiti waters of the Arabian Gulf. **Ichthyological Research**. v. 51, p. 263-268, 2004.

FRAILE, B.; SAEZ, F. J.; VICENTINI, C. A.; DE MIGUEL, M. P.; PANIAGUA, R. The testicular cycle of *Gambusia affinis holbrooki* (Teleostei: Poeciliidae). **J. Zool. Lond.** v. 228, p. 115-126, 1992.

GARCÍA-LÓPEZ, A.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; SARASQUETE, C. Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry. **Histol. Histopathol.** v. 20, p. 1179–1189, 2005.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. Reproduction of species of the genus *Cichla* in a Reservoir in Southeastern Brazil **Brazilian Journal of Biology**. v. 64, n. 3, p. 613-624, 2004.

GOMIEIRO, L. M.; VILLARES JUNIOR, G. A.; NAOUS, F. Reproduction of *Cichla kelberi* Kullander & Ferreira, 2006 introduced into an artificial lake in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 69, n.1, p. 175-183, 2009.

GRIER, H.J.; LINTON, J. R.; LEATHERLAND, J. F. & VLAMING, V. L. Structural evidence for two different testicular types in Teleost fishes. **The American Journal of Anatomy**. p. 331-345, 1980.

GRIER, H.J. Cellular Organization of the Testis and Spermatogenesis in Fishes. **Am. Zool.** v. 21, p. 345-357, 1981.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G.; REESE, R. O.; The mechanism of tubule elongation during

testicular recrudescence in the redbfish, *Sciaenops ocellatus* (Perciformes). **Proc. V Congr. Eur. Ichtyol. Stockolm, 1985.** KULLANDER, S. O.; FERNHOLM, B. editors. Stockolm: Swedish Museum of Natural History, 258-291, 1987.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the sertoli cells barrier. In: RUSSELL, Id., GRISWORLD, M.D. **The Sertoli Cell.** Clearwater, FL: Cache River Press, p.704-739, 1993.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the *common snook*. **Fish Biology.** v. 53, p. 521-542, 1998.

GRIER, H, J. The Germinal Epithelium: Its Dual Role in Establishing Male Reproductive Classes and Understanding the Basis for indeterminate Egg Production in Female Fishes. **Institute of Marine Sciences, Univertsity of Southern Mississippi.** v. 53, p. 537-552, 2002.

GRIER, H. J.; ARANZABAL, M. C. U. The Testis and Spermatogenesis in Teleosts. In: Jamieson, B. G. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)** (8), Part B: 2009.

ISHIBA, R.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; FRANÇA. G. F. Aspectos estruturais do desenvolvimento gonadal e relação gonadossomática de machos e fêmeas ao longo do ciclo reprodutivo anual em *Gymnotus carapo* cf. *carapo* (TELEOSTEI: GYMNOTIFORMES: GYMNOTIDAE). In: XXI Congresso de Iniciação Científica (CIC) – UNESP, 2009. **Anais do XXI CIC**, 2010, p.1-10.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. 2006. **Histologia Básica.** Guanabara Koogan. São Paulo. 524p.

KELBER, D. **Tucunaré uma paixão internacional.** 1999. Arte & Ciência. São Paulo, 96p.

KULLANDER, S. O.; FERREIRA, E. J. G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyological Exploration Freshwater**, v.17, p. 298-398, 2006.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. The spermatic duct of Bleniid fish (Teleostei, Bleniidae) Fine structure, histochemistry and function. **Zoomorphology**. v. 110, p. 63-73, 1990.

LAHNSTEINER, F.; NUSSBAUMER, B.; PATZNER, R. A. Unusual testicular accessory organs, the testicular blind pouches of Blennies (Teleostei, Bleniidae). Fine structure, enzyme-histochemistry and possible functions. **Journal of Fish Biology**. v. 42, p. 227-241, 1993a.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WEISMANN, T. The efferent duct system of the male gonads of the European pike (*Esox lucius*): testicular efferent ducts, testicular main ducts and spermatic ducts. A morphological, fine structural and histochemical study. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** v. 25, n. 4, p. 487-498, 1993b.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WEISMANN, T. Testicular main duct and spermatic ducts in some cyprinid fishes I. Morphology, fine structure and histochemistry. **Journal of Fish Biology**. v. 44, p. 937-951, 1994.

LAHNSTEINER, F. Morphology, fine structure, biochemistry, and function of the spermatic ducts in marine fish. **Tissue & Cell**. v. 35, p. 363-373, 2003.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. Male reproductive system: Spermatic duct and accessory organs of the testis. In: Jamieson, B. G. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)** 2009. Cap. 5, p. 143-185.

LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. **Biology of Reproduction**. v. 81, p. 177-187, 2009.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male Reproductive System in Fish. In: Knobil, E. and Neill, J.D. (eds) **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press. v. 3, p. 20-30, 1999.

LO NOSTRO, F.; GRIER, H.; GUERRERO, G. A. Involvement of the Gonadal Germinal Epithelium During Sex Reversal and Seasonal Testicular Cycling in the Protogynous Swamp

Eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). **Journal of Morphology**, Buenos Aires. v. 257, p. 107-126, 2003a.

LO NOSTRO, F. L.; GRIER, H.; MEIJIDE, F. J.; GUERRERO, G. A. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Synbranchidae): the germinal compartment. **Tissue & Cell**. v. 35, p. 121-132, 2003b.

MAGALHÃES, A. L. B.; SATO, Y.; RIZZO, E.; FERREIRA, R. M. A.; BAZZOLI, N. Ciclo reprodutivo do tucunaré *Cichla ocellaris* (Schneider, 1801), na represa de Três Marias, MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v. 48, p. 85-92, 1996.

MARTINS, Y. S.; MOURA, D. F.; SANTOS, G. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI. Comparative folliculogenesis and spermatogenesis of four teleost fish from a Reservoir in south-eastern Brazil. **Acta Zoologica (Stockholm)**. v. 91, p. 466–473, 2010.

MATTA, S. L. P.; GOMES, M. C. M.; ANDRADE, D. R. Reproductive Biology of the *Olygosarcus argenteus* (Gunther, 1864) Adult Males and Description of the Gonadal Maturation Stages. **Braz. Arch. Biol. Technol**. v. 52, p. 119-126, 2009.

MUÑOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET, S. Testicular structure and semicystic spermatogenesis in a specialized ovuliparous species: *Scorpaena notate* (Pisces, Scorpaenidae). **Acta Zoologica**. v. 83, p. 213–219, 2002.

MUÑOZ, M.; SÀBAT, M.; MALLOL, S.; CASADEVALL, M. Gonadal Structure and Gametogenesis of *Trigla lyra* (Pisces: Triglidae). **Zoological Studies**. v. 41, n. 4, p. 412-420, 2002.

MUÑOZ, H.; VAN DAMME, P. A.; DUPONCHELLE, F. Breeding behavior and distribution of the tucunare *Cichla* aff. *monoculus* in a clear water river of the Bolivian Amazon. **Journal of Fish Biology**. v. 69, 1018-1030, 2006.

MUÑOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET, S. Gonadal structure and gametogenesis of *Aspitrigla obscura* (Pisces, Triglidae). **Italian Journal of Zoology**. v. 68, n.1 p. 39-46, 2010.

NEGRÃO, J. N. C. **Aspectos ultraestruturais da espermatogênese da traíra, *Hoplias malabaricus***. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Botucatu. 1999.

NOBREGA, R. H. **Capacidade suporte das células de Sertoli e alterações do epitélio germinativo masculino e do tecido intersticial durante o ciclo reprodutivo de peixes neotropicais**. Monografia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. 2003.

NOBREGA, R. H.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Morphofunctional changes in Leydig cells throughout the continuous spermatogenesis of the freshwater teleost fish, *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes, Characidae): an ultrastructural and enzyme study. **Cell Tissue Research**. v. 329, p.339-349, 2007.

NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiol. Biochem**. v. 35, p. 197-206, 2009.

NORMANDO, F. T.; ARANTES, F. P.; LUZ, R. K.; THOME R. G.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Reproduction and fecundity of tucunare, *Cichla kelberi* (Perciformes: Cichlidae), an exotic species in Três Marias Reservoir, Southeastern Brazil. **J. Appl. Ichthyol**. v. 25, p. 299-305, 2009.

PARENTI, L. R.; GRIER, H. J. Evolution and Phylogeny of Gonad, Morphology in Bony Fishes. **Integr. Comp. Biol**. v. 44, p. 33–348, 2004.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. **Microscopy Research and Technique**. v. 32, p. 459-497, 1995.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; CARVALHO, E. D. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. **Tissue & Cell**. v. 31, n. 6, p. 561–567, 1999.

RICHTARSKI, U.; PATZNER, R. A. Comparative morphology of male reproductive systems in Mediterranean blennies (Bleniidae). **Journal o Fish Biology**. v. 56, p. 22-36, 2000.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LEGAC, F. CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**. v. 165, p. 390-411, 2010.

SELMAN, K.; A WALLACE, R. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **Amer. Zool.** Florida, n. 26, p.173-192, 1986

SHAHIN, A. A. B. Semicystic spermatogenesis and biflagellate spermatozoon ultrastructure in the Nile electric catfish *Malapterurus electricus* (Teleostei: Siluriformes: Malapteruridae). **Acta Zoologica**. v. 87, p. 215–227, 2006.

SOUZA, J. E. **Caracterização populacional de *Cichla kelberi* (PERCIFORMES: CICHLIDAE) no Reservatório do Lobo (Broa), Brtotas/ Itirapina - SP.** 2007.73f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

SOUZA, J. E.; FRAGOSO-MOURA, E. N.; FENERISH-VERANI, N.; ROCHA, O.; VERANI, J. R.; Population structure and reproductive biology of *Cichla kelberi* (Perciformes, Cichlidae) in Lobo Reservoir, Brazil. **Neotropical Ichthyology**. v. 6, n. 2, p. 201-210, 2008.

SPADELLA, M. A.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Morphology and Histology of Male and Female Reproductive Systems in the Inseminating Species *Scoloplax distolothrix* (Ostariophysi: Siluriformes: Scoloplacidae). **Journal of Morphology**. v. 269, p. 1114-1121, 2008.

SPINOLA, L. A. **Tática reprodutiva e estrutura da população de *Cichla monoculus spix & agassiz*, 1831 (PERCIFORMES, CICHLIDAE) em ambientes com diferentes regimes hidrológicos.** 2005. 29f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.

TAYLOR, R. G.; GRIER, H.; WHITTINGTON, J. A. Spawning rhythms of common snook. **Journal of Fish Biology**. v. 53, p. 502-520, 1998.

THACKER, C.; GRIER, H. Unusual gonad structure in the paedomorphic teleost *Schindleria praematura* (Teleostei: Gobioidae): a comparison with other gobioid fishes. **Journal of Fish Biology**. v. 66, p. 378-391, 2005.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. 1996. Eduem. Maringá, 169p.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do dourado (*Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849)**. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP.

VICENTINI, C. A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; BENETTI, E. J.; ORSI, M. Testicular ultrastructure and morphology of the seminal pathway in *Prochilodus scrofa*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** v. 33, p. 357-362, 2001.

VIEIRA, A. B. C.; SALVADOR-JR, L. F.; MELO, R. M. C.; SANTOS, G. B.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of the peacock bass *Cichla piquiti* (Perciformes: Cichlidae), an exotic species in a Neotropical reservoir. **Neotropical Ichthyology**. v. 7, n. 4, p. 745-750, 2009.

VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 28, p. 187-190, 2003.

CAPÍTULO 2

**Análise ultraestrutural da espermatogênese do ciclídeo Neotropical *Cichla Kelberi*
(Teleostei: Perciformes: Cichlidae)**

Análise ultraestrutural da espermatogênese do ciclídeo Neotropical *Cichla kelberi*

(Teleostei: Perciformes: Cichlidae)

Diógenes Henrique de Siqueira Silva, Carlos Alberto Vicentini, Rosicleire Veríssimo-Silveira.

RESUMO

Quinze exemplares machos maduros de *C. kelberi*, coletados no Reservatório de Jupia, rio Paraná, que tiveram os testículos fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2%, foram encaminhados para processamento e análise em microscopia eletrônica. O material obtido revelou uma espermatogênese do tipo cística, resultando na formação de um espermatozóide aquático Tipo I em *C. kelberi*. A análise da espermatogênese permitiu a identificação de dois tipos de células germinativas: as mitóticas, e as meióticas. No primeiro tipo, estão representadas as espermatogônias primárias e secundárias, caracterizadas pela presença de corpos cromatóides. Já as células meióticas incluem os espermatócitos primários, identificados pela compactação da cromatina e presença de complexos sinaptonêmicos e, espermatócitos secundários, menos volumosos e raramente observados. A espermiogênese mostra que as espermátides caracterizam-se, por uma compactação gradual da cromatina na forma de grumos; desenvolvimento flagelar; formação da fossa nuclear; rotação do núcleo e; eliminação do citoplasma residual. Os espermatozóides são formados por cabeça, peça intermediária e flagelo. A cabeça é esférica, não apresenta acrossoma e está envolvida por uma estreita faixa de citoplasma. A fossa nuclear apresenta uma projeção que adentra no núcleo. A peça intermediária é longa, devido a uma extensão de seu citoplasma, e abriga, aproximadamente, 10 mitocôndrias. O flagelo possui eixo perpendicular e ligeiramente excêntrico à base do núcleo, apresentando o clássico axonema 9+2. Possui duas expansões laterais da membrana flagelar que apresentam tamanhos variáveis.

Palavras-Chave: aquasperma; espermiogênese; tucunaré;

ABSTRACT

*Fifteen mature males specimen of Cichla kelberi, caught from the Jupia Reservoir, Paraná River that were fixed in paraformaldehyde 4% and glutaraldehyde 2%, were sent for processing and analyze in electronic microscopic. The material shown a cystic type spermatogenesis, resulting in the formation of a sperm water Type I in *C. kelberi*. The analysis of spermatogenesis allows the identification of two types of germ cells: the mitotic and meiotic. In the first type depicts the primary and secondary spermatogonia, characterized by the presence of chromatoid bodies. Already the meiotic cells include, the primary spermatocytes, identified by chromatin condensation and presence of synaptonemal complexes, and secondary spermatocytes, less large and rarely observed. Spermiogenesis shows that the spermatids are characterized by a gradual chromatin condensation in clusters form, flagellar development, formation of the nuclear fossa, nuclear rotation, and elimination of residual cytoplasm. Sperm are formed by head, midpiece and flagellum. The head is spherical, has no acrosome and is surrounded by a narrow strip of cytoplasm. The nuclear fossa shows a projection which enters into the nucleus. The midpiece is long, due to an extension of their cytoplasm and comprises about 10 mitochondria. The flagellum has axis perpendicular and slightly eccentric to the base of the nucleus, with the classical 9 + 2 axoneme. It has two lateral extensions of the flagellar membrane that have variable lengths.*

Key-words: *aquasperm; spermiogenesis; peacock bass.*

INTRODUÇÃO

O número de trabalhos considerando os aspectos ultraestruturais da espermatogênese nos teleósteos tem aumentado significativamente nos últimos anos, com o propósito de disponibilizar caracteres que possam auxiliar a esclarecer relações filogenéticas entre as espécies de peixes. Estes estudos têm sido conduzidos, particularmente, durante a espermiogênese, e com os próprios espermatozóides, devido à grande diversidade em sua forma e estrutura (BILLARD, 1970; MATTEI, 1970; BRUSLÉ, 1981; BILLARD, 1983; THAW *et al.*, 1990; JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991; WEITZMAN & MALABARBA, 1998; FALUGI *et al.*, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2001; GUSMÃO-POMPIANI, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003a; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003b; SPADELLA, 2004; VERÍSSIMO-SILVEIRA *et al.*, 2006; FRANÇA *et al.*, 2007; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007; GUSMÃO-POMPIANI *et al.*, 2009; PSENICKA *et al.*, 2010; SPADELLA *et al.*, 2010). Entretanto, cada espécie é caracterizada por uma organização particular das organelas espermáticas, num padrão geral uniforme e comum para toda a família (BACCETTI *et al.*, 1984).

Apesar dos inúmeros trabalhos referentes à ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de peixes existentes na literatura, os estudos relacionados à ultraestrutura das células germinativas iniciais do processo espermatogênico (espermatogônias e espermatócitos), são escassos (CRUZ-LANDIM & HOFLING, 1986/1987; MATOS *et al.*, 1993; MIURA, 1998; ANTONELI, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999; ANDRADE *et al.*, 2001; NEGRÃO *et al.*, 2002; SHAHIN, 2006). A família Cichlidae, considerada a terceira família de peixes mais diversificada da região Neotropical (REIS *et al.* 2003), agrupa uma gama de espécies de grande valor econômico, com especial destaque para o gênero *Cichla*, que reúne 15 espécies de peixes (algumas recentemente classificadas), reconhecidas por padrões de coloração e merística. Dentre as novas espécies deste gênero, popularmente conhecidas como tucunaré, está o *Cichla kelberi*, que se distingue das demais por apresentar pequenas manchas claras nas nadadeiras pélvica e anal e no lobo inferior da nadadeira caudal, sendo muito apreciada para a culinária e principalmente, para a pesca esportiva (KELBER, 1999; KULLANDER & FERREIRA, 2006).

Apesar das revisões filogenéticas (KULLANDER, 1986, 1998; SPARKS & SMITH, 2004) e da recente revisão taxonômica realizada por Kullander & Ferreira (2006) com o gênero *Cichla* (KULLANDER & FERREIRA 2006), muito pouco se conhece a respeito da

origem e taxonomia deste gênero (CARVALHO *et al.*, 2009). A fim de responder a estas questões, estudos citogenéticos têm sido conduzidos com algumas de suas espécies (CARVALHO *et al.*, 2009). Porém, as descrições da ultraestrutura da espermatogênese do gênero *Cichla* são escassas, sendo encontradas apenas para as espécies *C. ocellaris* e *C. intermedia* (CRUZ-LANDIM & HOFLING, 1986/1987; ANTONELI, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003a).

Deste modo, com o propósito de disponibilizar caracteres que possam ser úteis nos estudos filogenéticos entre as espécies do gênero *Cichla* e sua relação com os demais gêneros da família Cichlidae, estudaram-se as características ultraestruturais da espermatogênese do ciclídeo Neotropical *Cichla kelberi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 15 exemplares machos e adultos de *C. kelberi* foram capturados entre o período de março de 2009 a fevereiro de 2010, na Lagoa do Pernilongo (20° 29' 11,93"S, 51° 25' 33,27"O) e Ilha da Ferradura (20° 28' 27,11" S, 51° 25' 54,53"O), ambos localizados no Reservatório de Jupia, rio Paraná, situado no município de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil.

Depois de anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (0,5g de benzocaína em 5mL de álcool absoluto e 5L de água), os espécimes tiveram seus testículos removidos fragmentados e fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen, pH 7,4.

O material fixado foi encaminhado para processamento no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu, utilizando-se o seguinte protocolo:

- Lavagem em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (3x de 15 minutos);
- Pós-fixação em solução de Tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas;
- Lavagem em água destilada (3x de 5 minutos);
- Contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% por 2 horas;
- Desidratação em seqüência crescente de solução de acetona;
- Inclusão em Resina Epóxi (Araldite).

Cortes ultrafinos foram colhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila, lavados em álcool 50% e recontrastados em citrato de chumbo.

Os cortes assim preparados foram analisados e elétrôn-micrografados ao Microscópio eletrônico de transmissão Phillips-CM100.

RESULTADOS

Em *Cichla kelberi* todo o processo espermatogênico ocorre dentro de cistos, que estão presentes no interior do epitélio germinativo testicular. Cada cisto, formado por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli que se unem por meio de junções denominadas desmosomos (Fig. 20B), consiste de um grupo de células germinativas que estão, praticamente, em um mesmo estágio de desenvolvimento durante toda a espermatogênese (Fig. 20A).

A espermatogênese em *C. kelberi* tem início com as espermatogônias primárias, que são as maiores células da linhagem germinativa, sendo completamente envolvidas por células de Sertoli, que se apóiam na membrana basal (Fig. 20E). Seu núcleo é volumoso, esférico e central, com cromatina descompactada de aspecto granular e uniformemente distribuída. Possui um nucléolo excêntrico e elétrôn-denso (Fig. 20E). No citoplasma amplo, observa-se uma grande quantidade de material elétrôn-denso, chamados corpos cromatóides, associados a aglomerados de mitocôndrias, que se localizam nas proximidades do envoltório nuclear (Fig. 20F). As mitocôndrias são grandes, com formato esférico e ovalado (Fig. 20F). Vesículas e Complexos de Golgi são observados no citoplasma dessas células.

A espermatogônia primária sofre divisões mitóticas, dando origem às espermatogônias secundárias (Fig. 21A). Estas células são menores que suas precursoras e estão conectadas por pontes citoplasmáticas no interior de cada cisto, onde se encontram em número variável. Nas espermatogônias secundárias, o núcleo é circular e central, e apresenta um ou dois nucléolos. Seu diâmetro é reduzido e a cromatina é mais compactada em relação à espermatogônia primária. Nestas células a quantidade de corpos cromatóides é menor e as mitocôndrias adquirem varias conformações (Fig. 21A). Ao final do período das divisões mitóticas, as últimas gerações de espermatogônias secundárias, que são consideravelmente menores em tamanho, diferenciam-se em espermatócitos primários, dando início às divisões meióticas.

Os espermatócitos primários são células meióticas que permanecem interconectadas por pontes citoplasmáticas dentro de cada cisto (Fig. 21B). Possuem núcleo esférico com cromatina inicialmente difusa, e ausência de nucléolos (Fig. 21B). Durante a Prófase I, na fase

de Paquíteno, ocorre a formação do complexo protéico nuclear denominado complexo sinaptonêmico (Fig. 21C, D e F). Esta estrutura se forma caracteristicamente nesta fase do desenvolvimento celular. Durante a fase de Diplóteno da meiose I, ocorre um leve assincronismo entre as células germinativas contidas em um mesmo cisto, resultando em células em diferentes fases de desenvolvimento, o que pode ser constatado pelas diferentes figuras meióticas observadas no interior dos cistos (Fig. 21E). No citoplasma, além do complexo centriolar e do flagelo em formação, que se posicionam na lateral do núcleo, são encontradas mitocôndrias circulares ou alongadas, associadas ou não aos corpos cromatóides (Fig. 21F-G). Os espermatócitos primários sofrem a primeira divisão meiótica, originando os espermatócitos secundários, que são menores em tamanho, possuem citoplasma escasso, núcleo com contorno circular e cromatina compactada irregularmente. No citoplasma, são encontradas muitas mitocôndrias, mas os corpos cromatóides são escassos (Fig. 21H). Como resultado da segunda divisão meiótica, sofrida pelos espermatócitos secundários, são formadas as espermatídes.

No início da espermiogênese (processo por meio do qual espermatídes se diferenciam em espermatozóides), as espermatídes apresentam núcleo arredondado com cromatina homogeneamente distribuída e pouco condensada. O citoplasma envolve simetricamente o núcleo e possui poucas mitocôndrias arredondadas e levemente alongadas, com matriz de baixa densidade eletrônica (Fig. 22A-B). No complexo centriolar, o centríolo proximal está posicionado perpendicularmente em relação ao centríolo distal, que está ancorado na membrana plasmática (Fig. 22C). O centríolo distal se diferencia em corpúsculo basal, originando o axonema do flagelo (Fig. 22C), e todo o complexo centriolar se movimenta em direção a uma pequena depressão na lateral do núcleo, levando consigo a membrana plasmática e o segmento inicial do flagelo (Fig. 22D), deste modo, é formado um espaço entre a membrana plasmática e o flagelo, denominado canal citoplasmático (Fig. 22C).

No decorrer da espermiogênese o núcleo sofre uma rotação em relação ao segmento inicial do flagelo e a depressão em sua base progride, dando origem à fossa nuclear (Fig. 22E-G). A fossa nuclear é excêntrica e rasa, alojando o centríolo proximal e parte do centríolo distal (Figs. 22G e 23C). Ao final da rotação, o eixo flagelar está posicionado de maneira perpendicular e ligeiramente excêntrico à base do núcleo (Figs. 22H-I e 23D). Durante a espermiogênese ocorre uma compactação gradativa da cromatina, na forma de feixes filamentosos entremeados por áreas eletrôn-lúcidas, terminando na compactação desses feixes

em grumos justapostos, dando um aspecto heterogêneo ao núcleo, observado nas espermátides finais e, conseqüentemente nos espermatozóides (Fig. 23B-H).

Concomitantemente, a massa citoplasmática migra para a base do núcleo, em direção ao segmento inicial do flagelo, formando a futura peça intermediária do futuro espermatozóide, nela são observadas mitocôndrias esféricas e mais elétron-densas, complexo de Golgi e uma grande quantidade de vesículas próximas à base do núcleo (Fig. 23F-H). Todo o excesso de citoplasma é eliminado como corpos residuais na luz dos cistos e fagocitados pela célula de Sertoli, ao final da espermiogênese (Fig.23G).

No interior dos cistos as células germinativas encontram-se praticamente em um mesmo estágio de desenvolvimento e permanecem conectadas por pontes citoplasmáticas, entretanto, ao término da espermiogênese as pontes citoplasmáticas são eliminadas, os processos citoplasmáticos das células de Sertoli se separam, e os espermatozóides são lançados para a luz dos túbulos seminíferos. (Fig.23I).

Os espermatozóides de *C. kelberi* são as menores células da linhagem germinativa e são formados por cabeça, peça intermediária e flagelo, não sendo observada vesícula acrossomal (Fig. 24A). A cabeça é formada por uma estreita faixa de citoplasma, sem organelas, envolvendo um núcleo esférico, com cromatina compactada na forma de grumos justapostos. A fossa nuclear é rasa, em forma de arco único e excêntrica à base do núcleo, alojando todo o centríolo proximal e parte do centríolo distal. O arranjo do complexo centriolar se dá com o centríolo proximal anterior, lateral e oblíquo ao centríolo distal (Fig. 24E). A peça intermediária é curta em comprimento e contém mitocôndrias arredondadas, com matriz elétron-densa (Fig. 24A e E). Nesta, as organelas estão separadas do segmento inicial do flagelo por um canal citoplasmático. Apresenta na sua porção basal uma longa e estreita projeção citoplasmática, que se dilata em sua porção final, denominada por bainha citoplasmática (Fig. 24A). O flagelo é longo e possui eixo perpendicular e ligeiramente excêntrico em relação à base nuclear e, apresenta a clássica conformação do axonema 9+2 (nove duplas de microtúbulos periféricos e um par central) (Fig. 24A). São observadas projeções alares da membrana flagelar, também denominadas “fins” (Fig. 24D).

DISCUSSÃO

Assim como em *C. kelberi*, a espermatogênese nos peixes teleósteos, geralmente é do tipo cística, ocorrendo inteiramente no interior de cistos ou espermatocistos, que corresponde à unidade funcional básica da espermatogênese em anamniotas (peixes e anfíbios) (NEGRÃO *et al.*, 2002; CINQUENTTI & DRAMIS, 2003; LO-NOSTRO *et al.*, 2003a; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003; ARIAS *et al.*, 2004; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003a; SHAHIN, 2006; CHUNG, 2008; CHUNG *et al.*, 2010).

As espermatogônias primárias nos peixes teleósteos não são observadas em contato direto com a lâmina basal, como ocorre em mamíferos, estando sempre, completamente envolvidas por células de Sertoli (SCHULZ *et al.*, 2010). O material elétron-denso encontrado no citoplasma destas células, como observado em *C. kelberi*, recebe diferentes nomes na literatura, dentre eles, “nuage”, quando estão isolados, e “cimento intermitocondrial”, quando associados a mitocôndrias, são os mais difundidos (HAMAGUCHI, 1987; ANTONELI, 1999; NEGRÃO, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999; NEGRÃO *et al.*, 2002; CRUZ-LANDIM *et al.*, 2003; LO-NOSTRO *et al.*, 2003a; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003; BATLOUNI *et al.*, 2006; FISHELSON *et al.*, 2006; SHAHIN, 2006; SCHULZ *et al.*, 2010). Entretanto, Parvinen (2005), propõe que em células espermatogênicas este material deve ser denominado por corpo cromatóide. Os corpos cromatóides são constituídos de ribonucleoproteínas, que provavelmente estão relacionadas a algum produto do núcleo que cruza o complexo poro-nuclear e se acumula no citoplasma celular (PERUQUETTI *et al.*, 2010). Assim como em *Sorubim lima* (QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999), *Salminus maxillosus = brasiliensis* (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003) e *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO *et al.*, 2003a), em *C. kelberi* os corpos cromatóides são encontrados principalmente nas espermatogônias primárias. Segundo Negrão *et al.* (2002), a presença deste material no citoplasma das células germinativas, pode servir de referência para identificação deste tipo celular nos teleósteos. Entretanto, divergindo desses resultados, Antoneli (1999) relata a presença de um número maior de “nuages” = corpos cromatóides nas espermatogônias secundárias do também tucunaré, *C. intermedia*.

Como proposto por Selman & Wallace (1986), e evidenciado em *C. kelberi*, a presença de pontes citoplasmáticas entre as espermatogônias, pode ser utilizada para a distinção entre espermatogônias secundárias e primárias nos testículos de peixes. As modificações morfológicas entre as gerações de espermatogônias secundárias observadas em

C. kelberi e descritas em *Suribim lima* (QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999) e *Hoplias malabaricus* (NEGRÃO, 1999), podem ser identificadas segundo Schulz *et al.* (2010), verificando o tamanho nuclear/celular e o número de células por. Estas gerações podem variar em número entre as espécies, dependendo de sua posição filogenética (NÓBREGA *et al.*, 2009). Na tilápia do Nilo *Oreochromis Niloticus* (VILELA *et al.*, 2003) e em *Hoplias malabaricus* (BIZZOTTO & GODINHO, 2007), por exemplo, as espermatogônias secundárias passam por 8 gerações, já em *Gadus morhua* (ALMEIDA *et al.*, 2008) 10 ou 11 gerações são encontradas e no zebrafish *Danio rerio* 9 gerações são necessárias antes das espermatogônias entrarem na fase meiótica (LEAL *et al.*, 2009).

Os espermatócitos primários são caracterizados, principalmente, pela compactação da cromatina e presença de complexos sinaptonêmicos nos núcleos (CRUZ-LANDIM & CRUZ-HOFLING, 1986; MATOS *et al.*, 1993; MIURA, 1998, ANTONELI, 1999; NEGRÃO, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999 NEGRÃO *et al.*, 2002; BATLOUNI *et al.*, 2006; FISHELSON *et al.*, 2006). Os complexos sinaptonêmicos são complexas estruturas protéicas, envolvidas no pareamento dos cromossomos homólogos durante a troca gênica (NEGRÃO, 1999). Como em *C. intermedia* (ANTONELI, 1999), em *C. kelberi* os complexos sinaptonêmicos se formam a partir do envoltório nuclear e avançam em direção à região central do núcleo. Algumas outras características observadas em *C. kelberi*, também se assemelham à *C. intermedia* nesta fase (ANTONELI, 1999), dentre elas, o desaparecimento de nucléolos, a redução no número das mitocôndrias e dos corpos cromatóides. Entre os espermatócitos, os espermatócitos primários em paquíteno são as células meióticas mais freqüentes em *C. kelberi* e *Danio rerio* (LEAL *et al.*, 2009). Já os espermatócitos secundários, sofrem uma rápida divisão durante a meiose II (SELMAN & WALLACE, 1986; MIURA, 1998), sendo raramente observados no testículo de *C. kelberi*, *C. intermedia* (ANTONELI, 1999), *Hoplias malabaricus* (NEGRÃO, 1999), *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO *et al.*, 2003a), e *Danio rerio* (LEAL *et al.*, 2009).

A espermiogênese nos teleósteos tem revelado espermatozóides bastante divergentes em forma e estrutura (MATTEI, 1970, 1991), podendo ser classificados em “aquasperma” e “introsperma”, característico de peixes com fertilização externa e interna, respectivamente (JAMIESON, 1991). Deste modo, a estratégia de fertilização externa adotada por *C. kelberi*, permite classificar seu espermatozóide como do tipo aquasperma. Além disso, a ausência de acrossoma e a presença de um único flagelo, o caracteriza como o tipo básico de

espermatozóide em teleósteos, conhecido como espermatozóide aquasperma anacrossomal simples ou aquasperma uniflagelado anacrossomal (JAMIESON, 1991).

Além dos tipos “aquasperma” e “introesperma”, Mattei (1970), com base na análise comparativa da espermiogênese em teleósteos, caracterizou os espermatozoides em dois tipos (Tipo I e Tipo II), dependendo da ocorrência ou ausência de rotação nuclear. No Tipo I, a rotação nuclear posiciona o flagelo perpendicularmente em relação ao núcleo, enquanto no Tipo II, o flagelo se mantém em posição paralela ao núcleo. Em Perciformes, ambos os tipos estão presentes, porém, o Tipo II é o mais freqüente, sendo, inclusive, chamado de espermatozóide tipo perciforme, graças a sua ampla difusão entre os representantes desta ordem (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991; ABASCAL *et al.*, 2002). Apesar disso, como observado em *C. kelberi*, na família Cichlidae ocorre o espermatozóide Tipo I (CRUZ-LANDIM & CRUZ-HOFLING, 1986/1987; SILVA & GODINHO, 1991; MATOS *et al.*, 1995; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003b). Entretanto, equivocadamente, Antoneli (1999) classificou o espermatozóide do tucunaré *C. intermedia* como do tipo perciforme.

O padrão de compactação da cromatina observado no núcleo do espermatozóide de *C. kelberi*, foi o mesmo ao encontrado por Cruz-Landim & Cruz-Hofling (1986/1987), Antoneli (1999) e Quagio-Grassiotto *et al.* (2003b), para os espermatozoides de *C. ocellaris* e *C. intermedia*, únicas espécies de *Cichla* que tiveram a ultraestrutura do espermatozóide estudada até o momento. Entretanto, Antoneli (1999) descreve uma maior intensidade na compactação dos grumos de cromatina localizados no centro do núcleo em *C. intermedia*, diferindo, portanto, de *C. kelberi*. Ainda com relação à cabeça do espermatozóide, *C. kelberi*, apresenta o formato esférico, tipicamente encontrado em ciclídeos (MATTEI, 1970; CRUZ-LANDIM & CRUZ-HOFLING, 1986/1987; SILVA & GODINHO, 1991; MATOS *et al.*, 1995; ANTONELI, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003b). Similar ao que foi observado em *C. kelberi*, no tucunaré *C. intermedia* (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003b) e em *Crenicichla saxatilis* (MATOS *et al.*, 1995), a fossa nuclear é levemente excêntrica à base do núcleo.

Nos teleósteos, a maioria dos espermatozoides “aquasperma” descritos são compostos por cabeça, peça intermediária e flagelo (JAMIESON, 1991). A peça intermediária é formada a partir do deslocamento da massa citoplasmática para a região basal do núcleo durante o processo espermiogênico (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007). Em algumas espécies, ela pode apresentar modificações características, a exemplo do que ocorre nos Characiformes *Apareiodon affinis*, *Rhaphiodon vulpinus*, *Prochilodus lineatus*, (VERÍSSIMO-SILVEIRA,

2007), que apresentam um prolongamento citoplasmático, chamado bainha citoplasmática. Nos ciclídeos *C. ocellaris* (CRUZ-LANDIM & CRUZ-HOFLING, 1986/1987), *Oreochromis niloticus* (SILVA & GODINHO, 1991) e *C. intermedia* (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003b), uma estrutura similar está presente, entretanto, assim como em *C. kelberi*, nestas espécies, esta estrutura apresenta uma dilatação em sua extremidade final. O número, forma e distribuição das mitocôndrias em *C. kelberi* é comum para os ciclídeos (MATTEI, 1970; CRUZ-LANDIM & CRUZ-HOFLING, 1986/1987; SILVA & GODINHO, 1991; MATOS *et al.*, 1995; ANTONELI, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003b), e se enquadra no padrão descrito por Jamieson (1991) e Mattei (1991), para os espermatozóides da ordem Perciformes.

Em Perciformes, o espermatozóide geralmente apresenta um único flagelo, exibindo o clássico axonema 9 + 2. Entretanto, na família Apogonidae, o gameta biflagelado está presente (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991). Com exceção de *Satanoperca jurupari* (MATOS *et al.*, 2002) que possui espermatozóide biflagelado, o restante dos ciclídeos que tiveram seus espermatozóides descritos (CRUZ-LANDIM & CRUZ-HOFLING, 1986/1987; SILVA & GODINHO, 1991; ANTONELI, 1999; MATOS *et al.*, 1995; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003b), apresentam os mesmos com um único flagelo, como observado em *C. kelberi*. Também em Perciformes, alguns de seus representantes, podem formar uma duas ou três extensões laterais provenientes da membrana flagelar, nomeadas aletas laterais ou “fins” (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991). Semelhante a *C. kelberi*, os demais ciclídeos apresentam um par de aletas laterais de tamanhos variados (CRUZ-LANDIM & CRUZ-HOFLING, 1986/1987; SILVA & GODINHO, 1991; ANTONELI, 1999; MATOS *et al.*, 1995; MATOS *et al.*, 2002; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003b).

Considerando que a família Cichlidae é a terceira família de peixes mais diversificada da região Neotropical, muito pouco se conhece acerca das características ultraestruturais da espermatogênese de seus representantes. Mesmo assim, Quagio-Grassiotto *et al.* (2003b) relaciona três características que seriam padrão entre os ciclídeos: 1) Compactação cromatínica em grumos filamentosos; 2) fossa nuclear levemente excêntrica e 3) Grande número de mitocôndrias (aproximadamente 10) em torno do segmento inicial do flagelo. Com exceção da última característica, já que em *C. kelberi* ocorre um número reduzido de mitocôndrias, as demais são pertinentes às observadas neste estudo para o espermatozóide de *C. kelberi*. Entretanto, novos trabalhos devem ser conduzidos para se obter uma padronização dos espermatozóides em Cichlidae. Portanto, o estudo das características ultraestruturais dos

espermatozóides de novas espécies de ciclídeos, deve auxiliar no entendimento do significado evolutivo e reprodutivo destes caracteres para a família Cichlidae.

FIGURAS

FIGURA 20. Características ultraestruturais da espermatogênese em *Cichla kelberi*. **A:** Espermatogênese cística: detalhe de um cisto de espermatocistos primários. 1.450x. **B:** Complexos juncionais, com destaque para formação de desmossomos (■) e alça do prolongamento citoplasmático da célula de Sertoli (□). 21.500x. **Inset:** Desmossomo em detalhe. **C e D:** Pontes intercitoplasmáticas (⇒). 3.400x e 4.600x. **E:** Espermatogônia primária. 2.650x. **F:** Citoplasma da espermatogônia primária 8.400x. **Cb** = corpos cromatóides, **Cs** = Cisto espermatogênico, **Sg1** = Espermatogônia primária, **m** = mitocôndrias, **n** = núcleo, **nu** = nucléolo, **S** = célula de Sertoli, □ Desmossomos, ■ Prolongamento citoplasmático da célula de Sertoli, ⇒ Pontes intercitoplasmáticas.

FIGURA 20

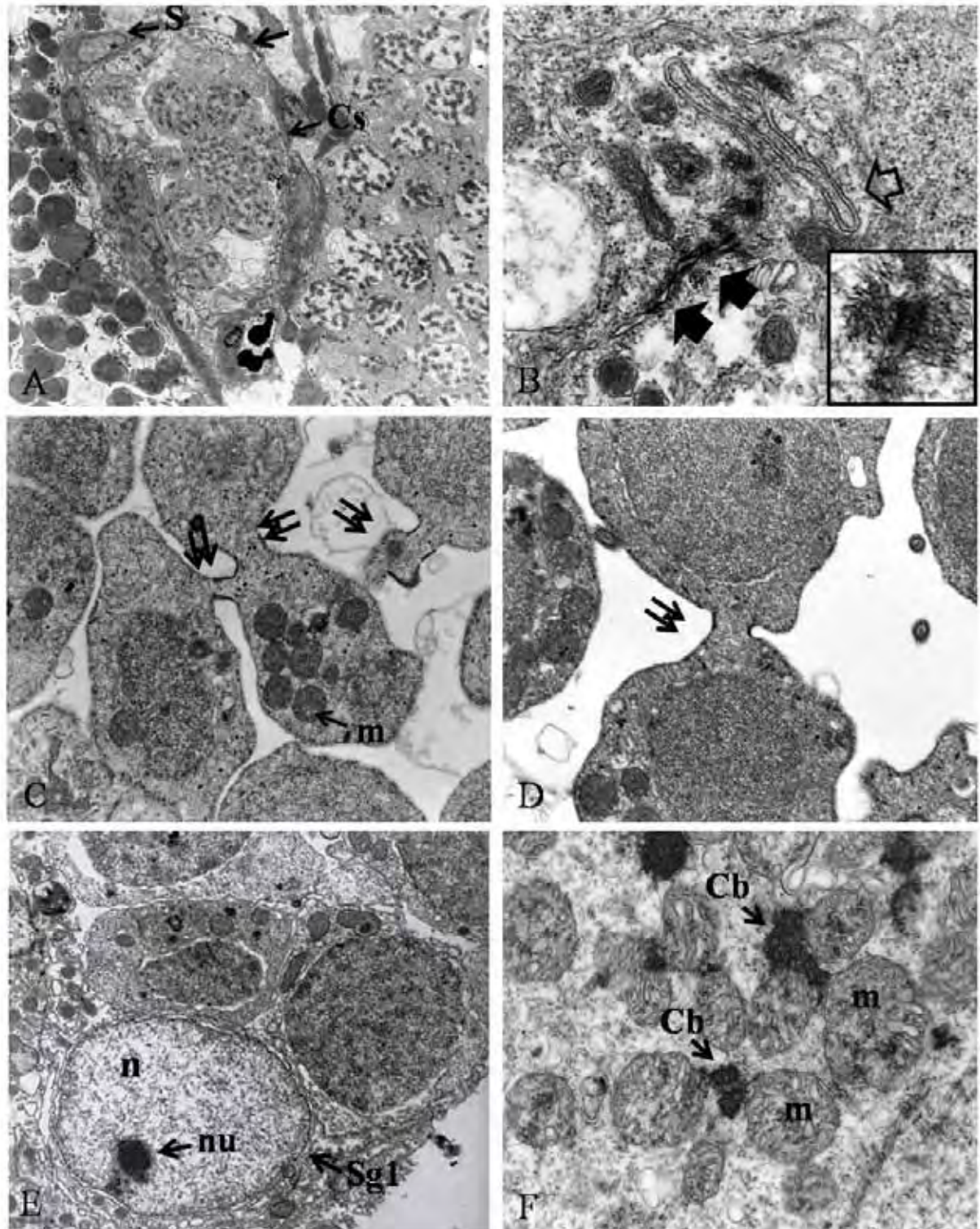


FIGURA 21. Características ultraestruturais da espermatogênese em *Cichla kelberi*. **A:** Espermatogônias secundárias (**Sg2**). 1.550x. **B:** Cisto de espermatócitos primários (**Sc1**). 870x. **C e D:** Detalhe de espermatócitos primários, mostrando os complexos sinaptonêmicos ($\rightarrow$). 2.650x e 1.950x. **E:** Cisto de em Paquíteno da Prófase I, evidenciando um leve assincronismo entre os espermatócitos primários (**Sc1**) 2.490x. **F:** Detalhe do citoplasma de um espermatócito primário, mostrando mitocôndrias de variadas formas (**m**) e associadas ao material eletrondenso (**Cb**). 4.600x. **G:** Detalhe de espermatócito primário, com destaque para a presença do complexo centriolar e início da formação do flagelo(**c**), posicionado lateralmente ao núcleo. 4.600x **H:** Cisto de espermatócitos secundários 1.550x. **c**= complexo centriolar e flagelo em formação, **Cb** = corpos cromatóides, **ci** = citoplasma, **Cs** = Cisto espermatogênico, **m** = mitocôndrias, **mt** = núcleo metafásico, **n** = núcleo, **nu** = nucléolo, **S** = célula de Sertoli, **Sg2** = Espermatogônia secundária, **Sc1** = Espermatócito primário, **Sc2** = Espermatócito secundário, $\rightarrow$ Complexo sinaptonêmico, $\Rightarrow$ Pontes intercitoplasmáticas

FIGURA 21

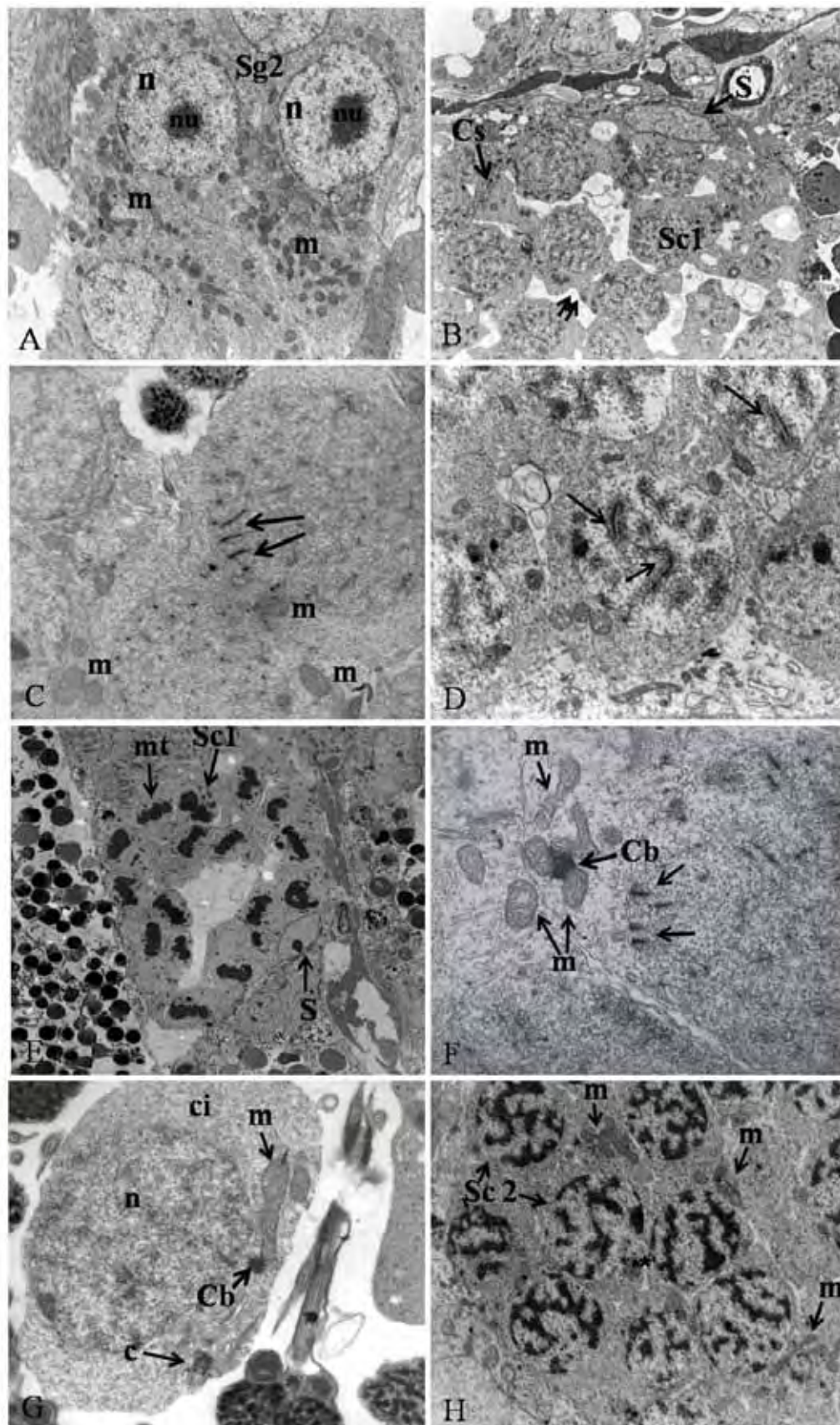


FIGURA 22. Características ultraestruturais da espermiogênese em *Cichla kelberi*. **A:** Cisto de espermatídes iniciais. 1.150x. **B:** Espermatíde inicial. 6.300x. **C:** Espermatíde inicial, com detalhe para o posicionamento dos centríolos em relação ao núcleo. 6.300x. **D:** Núcleo de espermatíde em rotação 4.600x. **E:** Centríolo proximal adentrando a fossa basal. 4.600x **F:** Espermatíde inicial com formação de fossa basal. 6.300x. **G:** Canais citoplasmáticos (→) e centríolo proximal (**p**) na fossa basal de uma espermatíde. 3.400x. **H:** Posicionamento do flagelo em relação ao núcleo. 3.400x. **I:** Espermatíde ao término da rotação nuclear. 1.950x. **ci** = citoplasma, **Cs** = Cisto espermatogênico, **d** = centríolo distal, **Et** = espermatíde, **f** = flagelo, **m** = mitocôndrias, **n** = núcleo, **p** = centríolo proximal, → canais citoplasmáticos, ■ fossa nuclear, ⇨ Flagelo em posição perpendicular e excêntrica em relação à base do núcleo.

FIGURA 22

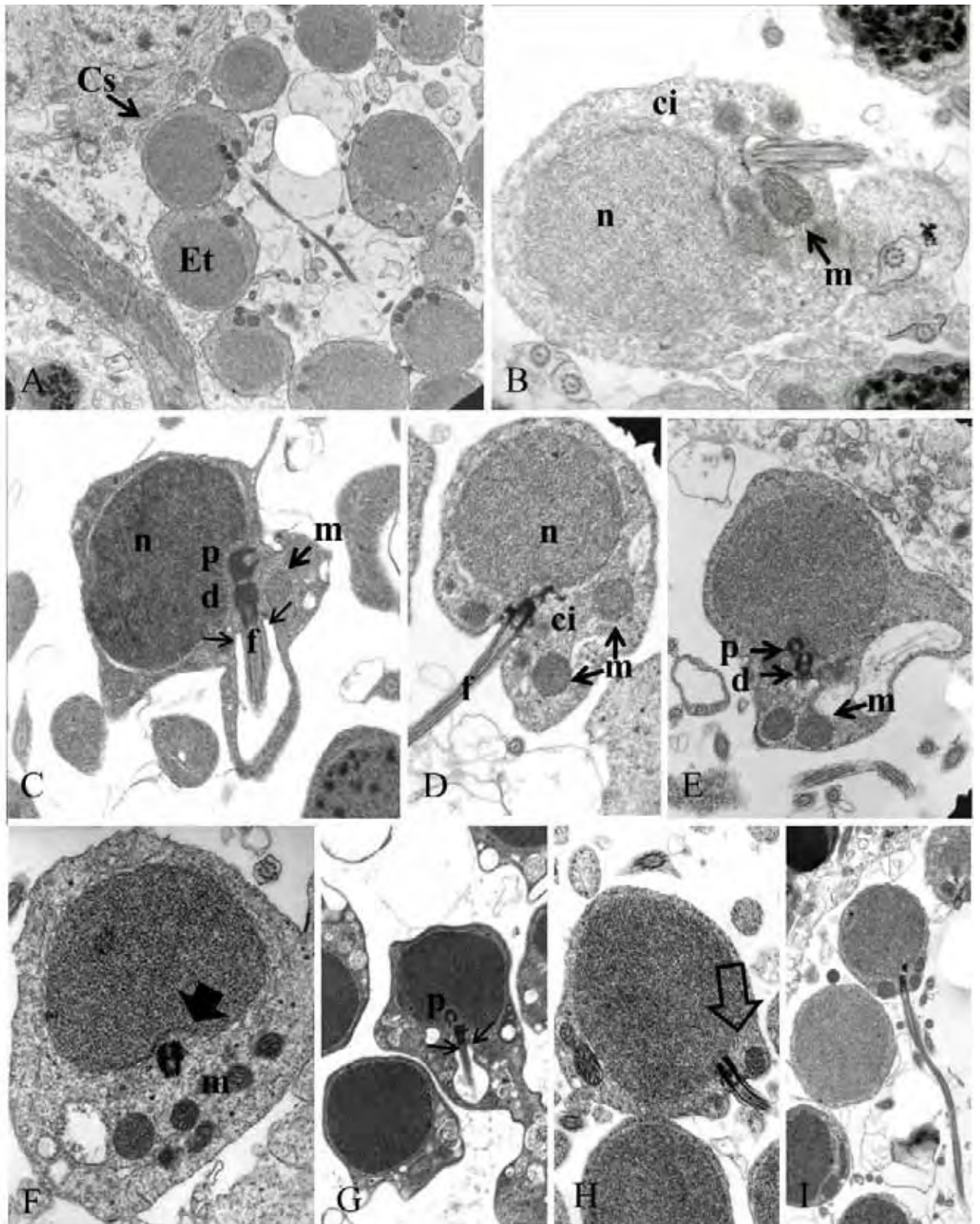


FIGURA 23. Características ultraestruturais da espermiogênese em *Cichla kelberi*. **A:** Cisto de espermatídes em início da compactação em grumos da cromatina nuclear. 1.550x. **B:** Detalhe de espermatíde, sofrendo compactação da cromatina nuclear. 4.600x. **C:** Detalhe da base do núcleo e região da futura peça intermediária do espermatozóide, com destaque para a projeção da fossa nuclear para o interior do núcleo (■). 11.500x. **D:** Espermatíde final com cromatina nuclear totalmente compactada em grumos (*). 4.600x. **E:** Espermatíde final, com detalhe para a posição excêntrica do flagelo em relação ao núcleo (□). 3.400x. **F:** Mitocôndrias ao redor da porção inicial do flagelo. 4.600x. **G:** Cisto de espermatídes finais, com detalhe para a presença de pontes intercitoplasmática (⇒) e massa citoplasmática sendo eliminada (**Mc**). 4.600x. **H:** Espermatíde final, mostrando as mitocôndrias esféricas e levemente alongadas (**m**). 8.400x. **I:** Cisto de espermatídes finais prontas para serem liberadas para a luz lobular (**L**). 650x. **Cs** = Cisto espermatogênico, **d** = centríolo distal, **Et** = espermatíde, **f** = flagelo, **L** = lúmen lobular, **m** = mitocôndrias, **Mc** = massa citoplasmática, **p** = centríolo proximal, **Sc1** = espermatócitos primários, **Sz** = espermatozóides, ⇒ canais citoplasmáticos, ■ projeção da fossa nuclear, □ Flagelo em posição perpendicular e excêntrica em relação à base do núcleo, ► Projeção citoplasmática da célula de Sertoli, prestes a se romper,► projeção citoplasmática da peça intermediária, * padrão de compactação em grumos da cromatina.

FIGURA 23

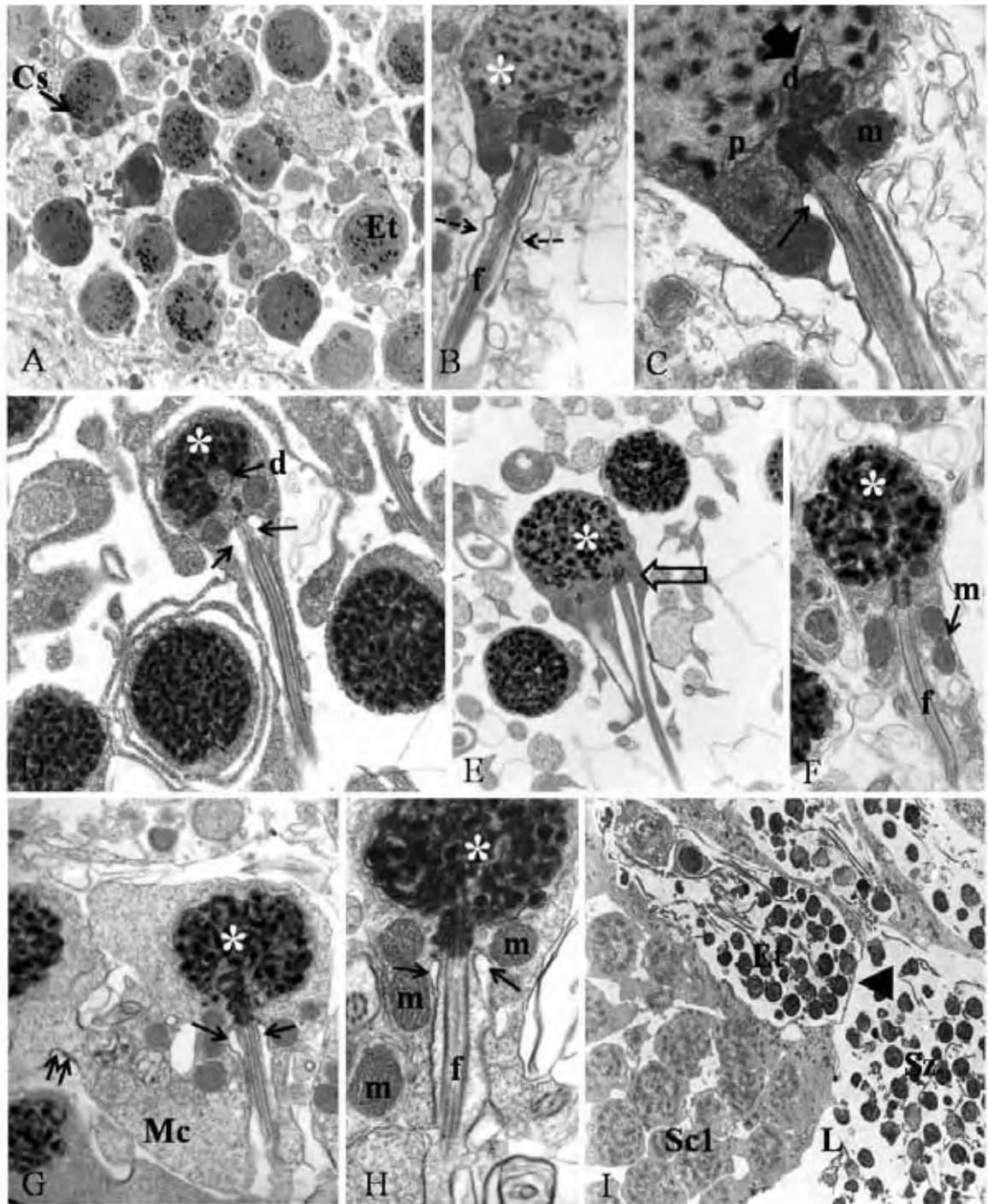
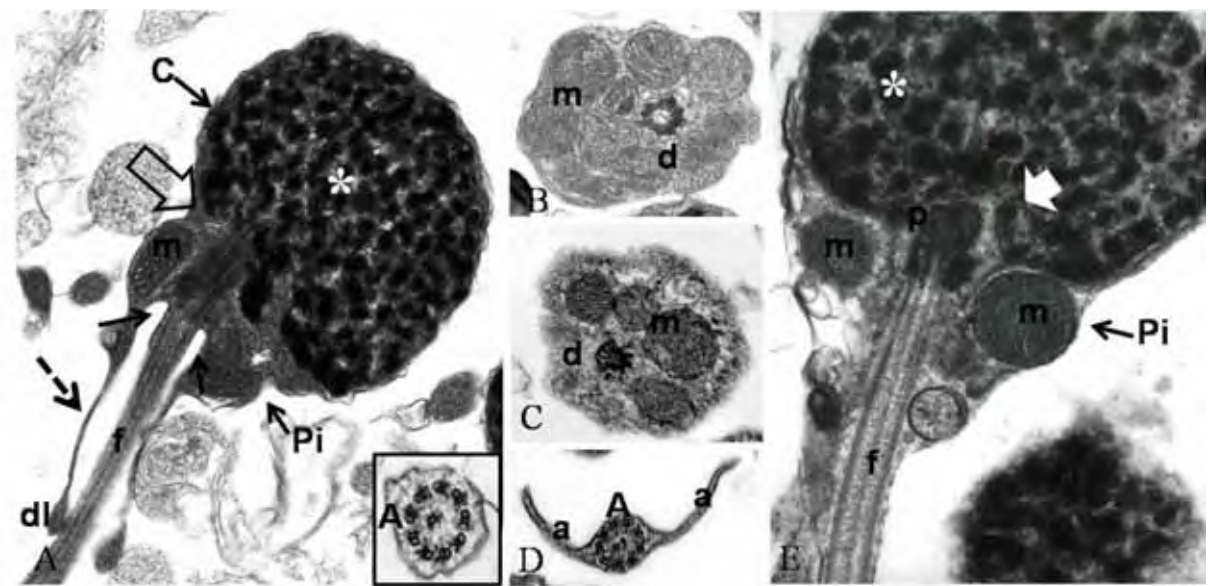


FIGURA 24. Características ultraestruturais do espermatozóide de *Cichla kelberi*. **A e E:** Espermatozóide de *Cichla kelberi* 6.300x e 11.500x. Em A **Inset** = Axonema com arranjo de microtúbulos (9+2). **B e C:** Corte transversal da região da peça intermediária, com destaque para as mitocôndrias (**m**) em torno do centríolo distal (**d**) 2.300x e 4.600x. **D:** Corte transversal do flagelo. 8.400x. **A** = axonema, **a** = aletas laterais (projeções laterais da membrana flagelar), **c** = cabeça do espermatozóide, **d** = centríolo distal, **dl** = dilatação da expansão citoplasmática da peça intermediária, **f** = flagelo, **m** = mitocôndrias, **p** = centríolo proximal, **Pi** = peça intermediária, **■** projeção da fossa, **→** canais citoplasmáticos, **⇨** Flagelo em posição perpendicular e excêntrica em relação à base do núcleo, **.....▶** projeção citoplasmática da peça intermediária, * padrão de compactação em grumos da cromatina.

FIGURA 24



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASCAL, F. J.; MEDINA, A.; MEGINA, C.; CALZADA, A. Ultrastructure of *Thunnus thynnus* and *Euthynnus alletteratus* spermatozoa. **Journal of Fish Biology**. v. 60, p. 147-153, 2002.
- ALMEIDA, F. F. L.; KRISTOFFERSEN, C.; TARANGER, G. L.; SCHULZ, W. Spermatogenesis in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): A Novel Model of Cystic Germ Cell Development. **Biology of Reproduction**. v.78, p. 27-34, 2008.
- ANDRADE R.F.; BAZZOLI N.; RIZZO E.; SATO Y. Continuous gametogenesis in the Neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). **Tissue & Cell**, v. 33, p. 524-532, 2001.
- ANTONELLI, F. N. **Aspectos Ultraestruturais da Espermatogênese no Tucunaré, *Cichla intermédia*, do Reservatório de Volta Grande (Rio Grande, MG)**. 1999. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Botucatu - SP.
- ARIAS, J. C.; ZANIBONI-FILHO, E.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Ciclo testicular del Yamú, *Brycon siebenthalae* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) en cautivero. **Actual Biol**. v. 26, n. 81, p. 185-195, 2004.
- BACCETTI, B.; BURRINI, A.G.; CALLAINI, G.; GILBERTINI, G.; MAZZINI, M.; ZERUNIAN, S. Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. **Gamete Res**. v.10, p.373-96, 1984.
- BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive Cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei: Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium an approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**. v. 96, p. 116-132, 2006.
- BILLARD, R. Ultrastructure comparée de spermatozoïdes de quelques poissons teleosteens. In: BACCETTI, B. (Ed) **Comparative Spermatology**. Academic Press, New York, 1970. p.71-80.

BILLARD, R. Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) – An ultrastructural study. **Cell Tissue Research**. v. 233, n. 2, p. 265-284, 1983.

BIZZOTTO, P. M. & GODINHO, H. P. Morphometric evaluation of the spermatogenesis in trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Characiformes, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 24, n. 3, p. 541-544, 2007.

BRUSLÉ, S. Ultrastructure of spermiogenesis in *Liza aurata* Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae). **Cell Tissue Res.** v. 217, p. 415-424, 1981.

CARVALHO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; SANTOS, J. E.; TESKE, P.; BOHEREGARAY, L. B.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic characterization of native and introduced populations of the Neotropical cichlid genus *Cichla* in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 32, n. 3, p. 601-607, 2009.

CHUNG, E. Y. Ultrastructure of germ cells, the Leydig cells, and Sertoli cells during spermatogenesis in *Boleophthalmus pectinirostris* (Teleostei, Perciformes, Gobiidae). **Tissue and Cell**. v.40, n.3, p. 195-205. 2008.

CHUNG, Y. E.; YANG, Y. C.; KANG, H. W.; CHOI, K. H.; JUN, J. C.; LEE, K. Y. Ultrastructure of Germ Cells and the Functions of Leydig Cells and Sertoli Cells Associated with Spermatogenesis in *Pampus argenteus* (Teleostei: Perciformes: Stromateidae). **Zoological Studies**. v. 49, n. 1, p. 39-50, 2010.

CINQUETTI, R.; DRAMIS, L. Histological, histochemical, enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* between annual breeding seasons. **Journal of Fish Biology**. v. 63, p. 1402-1428, 2003

CRUZ-LANDIM, C.; CRUZ-HOFLING, M.A. Aspectos da espermatogênese de tucunaré (*Cichla ocellaris* Schneider, 1801) (Teleostei, Cichlidae). **Acta Amazônica**. v. 16/17, p. 65–72, 1986/1987.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C.; CRUZ-HOFLING, M. A. Morphological of the spermatogenesis in the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **Biocell**. v. 27, n. 3, p. 319-328, 2003.

FALUGI, C.; BACCETTI, B.; RENIERI, T.; MORETTI, E.; ANGELINI, C.; CAMPANELLA, C.; PISANO, E.; PIOMBONI, P. Ultrastructural analysis of the spermatozoa of three Antarctic fish species. **J Submicrosc. Cytol. Pathol.** v. 31, n. 2, p. 197-202, 1999.

FRANÇA, G. F.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Gymnotus cf. anguillaris* and *Brachyhypopomus cf. innicaudatus* (Teleostei: Gymnotiformes) **Tissue and Cell.** v. 39, p. 131–139, 2007.

FISHELSON, L.; DELAREA, Y.; GON, O. Testis structure, spermatogenesis, spermatocytogenesis, and sperm structure in cardinal fish (Apogonidae, Perciformes). **Anat. Embryol.** v. 211, p. 31-46, 2006.

GUSMÃO-POMPIANI, P.G. **Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da Ordem Characiformes, Família Characidae (Teleostei, Ostariophysi): uma abordagem filogenética.** 2003. Tese (Doutorado). IBB - Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP.

GUSMÃO-POMPIANI, P.; MALABARBA, L. R.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in Serrasalminae (Ostariophysi:Characiformes) with further evidence on the relationships of the piranhas e pacus. **Neotropical Ichthyology.** v. 7, p. 385-394, 2009.

HAMAGUCHI, S. The structure of the germinal dense bodies (nuages) during differentiation of the male germ line of the teleost, *Oryzas latipes*. **Cell Tissue Research.** v. 248, p. 375-389, 1987.

JAMIESON, B.G.M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa.** Cambridge: Cambridge University Press. 1991. 319p.

KELBER, D. Tucunaré uma paixão internacional. 1999. Arte & Ciência. São Paulo, 1999.

KULLANDER, S.O. A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA Z.

M.; LUCENA, C. A. S. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre, EDIPUCRS, 1998. 603p.

KULLANDER, S. O.; FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyological Exploration Freshwater**, v.17, p. 298-398, 2006.

LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. **Biology of Reproduction**. v.81, p. 177-187, 2009.

LO NOSTRO, F.; GRIER, H.; GUERRERO, G. A. Involvement of the Gonadal Germinal Epithelium During Sex Reversal and Seasonal Testicular Cycling in the Protogynous Swamp Eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). **Journal of Morphology**, Buenos Aires. v. 257, p. 107-126, 2003a.

MATOS, E.; MATOS, P.; OLIVEIRA, E.; AZEVEDO, C. Ultraestrutura do espermatozóide do pacu, *Metynnis maculatus* Kner, 1860 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**. v. 10, p.7-10, 1993.

MATOS, E.; MATOS, P.; CORRAL, L.; AZEVEDO, C. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Crenicichla saxatilis* Linnaeus, 1758 (Pisces, Teleostei) from the Amazon Region. Braz. **J. Morphol. Sci.** v.12, p.109-14, 1995.

MATOS, E.; SANTOS, M. N. S.; AZEVEDO, C. Biflagellate spermatozoon structure of the hermaphrodite fish *Satanoperca jurupari* (Heckel, 1840) (Teleostei, Cichlidae) from the Amazon River. **Brazilian Journal of Biology**. v. 62, n. 4B, p. 847-852, 2002.

MATTEI, X. Spermiogenèse comparée des poisson. In: BACCETTI, B. (Ed) **Comparative Spermatology**. Academic Press, New York, 1970. p.57-70.

MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Can. J. Zool.** v.69, p.3038-55, 1991.

MIURA, T. Spermatogenetic cycle in fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press. 1998. p.571-78.

NEGRÃO, J. N. C. **Aspectos Ultraestruturais da Espermatogênese da Traíra, *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae)**. 1999. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

NEGRÃO, J. N. C.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermatogonia and spermatocyte ultrastructure in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes: Erythrinidae). **J. Zool. Lond.** v. 257, p. 287-293, 2002.

NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiol. Biochem.** v. 35, p. 197-206, 2009.

PARVINEN, M. The cromatoid body in spermatogenesis. **Int. J. Androl.** v. 28, p. 189-201, 2005.

PERUQUETTI, R. L.; TABOGA, S. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Nucleolar Cycle and Its Correlation with Chromatoid Bodies in the *Tilapia rendali* (Teleostei, Cichlidae, Spermatogenesis). **The Anatomical Record**. v. 293, p. 900-910, 2010.

KULLANDER, S.O. 1986. **Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru**. Museum of Natural History. Stockholm. 431p.

PSENICKA, M.; RODINA, M.; LINHART, O. Ultrastructural study on the fertilization process in sturgeon (Acipenses), function of acrosome and prevention of polyspermy. **Animal Reproduction Science**. v. 117, n. ½, p. 147-154, 2010.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; CARVALHO, E. D. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. **Tissue & Cell**. v. 31, n. 6, p. 561–567, 1999.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; NEGRÃO, J.N.C.; CARVALHO, E.D.; FORESTI, F. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). **J. Fish Biol.**, v.59, p.1494-502, 2001.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; SPADELLA, M. A.; CARVALHO, M.; OLIVEIRA, C. Comparative description and discussion of spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in some species of Heptapteridae and Pseudopimelodidae (Teleostei: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**. v. 1, n. 1, p. 35-45, 2003a.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; ANTONELI, F.N.; OLIVEIRA, C. Spermiogenesis and sperm ultrastructure in *Cichla intermedia* with some considerations about Labroidei spermatozoa (Teleostei, Perciformes, Cichlidae). **Tissue & Cell**. v. 35, p. 441–446, 2003b.

REIS, R. E., KULLANDER, S. O., FERRARIS JR, C. J. 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS. Porto Alegre. 742p.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LEGAC, F. CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**. v. 165, p. 390-411, 2010.

SELMAN, K. & WALLACE, R. A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **Am. Zool.** v. 26, p. 73-192, 1986.

SHAHIN, A. A. B. Spermatogenesis and Spermatozoon ultrastructure in the Nile Pebblyfish *Alestes dentex* (Teleostei: Characiformes: Alestidae) in Egypt. **W. J. Zoology**. v.1, p.1-16, 2006.

SILVA, M. & GODINHO, H.P. O espermatozóide de *Oreochromis niloticus* (Peixe, Teleósteo). **Rev. Bras. Biol.** v. 51, n.1, p. 39-43. 1991.

SPADELLA, M. A. **Estudo filogenético na superfamília Loricarioidea (TELEOSTEI: SILURIFORMES) com base na ultraestrutura dos espermatozóides**. 2004. 175f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

SPADELLA, M. A.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. . Spermogenesis and spermatozoal ultrastructure in Trychomycteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes). **Acta Zoologica (Stockholm)**, v. 91, p. 373-389, 2010.

SPARKS, J. S.; SMITH, W.L. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). **Cladistics**. v. 20, p.501–517, 2004.

THAW, O.T.; THAM, D.; MATTEI, X. Extension of the proximal centriole in a teleost fish spermatozoon. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** v. 22, p. 357-360, 1990.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do dourado (*Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849)**. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; GUSMÃO-POMPIANI, P.; VICENTINI, C. A.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoológica (Stockholm)**. v. 87, p.305-313, 2006.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ultraestrutura da Espermiogênese e dos Espermatozóides de peixes da Subordem Characoidei (Teleostei, Characiformes): uma abordagem filogenética**. 2007.131f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. Spermogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 28, p. 187-190, 2003.

WEITZMAN, S.H.; MALABARBA, L.R. Perspectives about the Phylogeny and Classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Eds) **Phylogeny and Classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p.161-169.

VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Como nos demais representantes do gênero *Cichla*, a reprodução em *C. kelberi*, é do tipo parcelada, ocorrendo ao longo de todo o ano, com dois picos reprodutivos bem definidos.
- ✓ A utilização das alterações do epitélio germinativo para definição das Classes reprodutivas em peixes mostrou-se eficiente, sendo aplicada na definição das Classes de Maturação Inicial, Maturação Intermediária, Maturação Final e Regressão durante o ciclo reprodutivo do tucunaré amarelo *Cichla kelberi*.
- ✓ As análises histológicas das gônadas de *Cichla kelberi* revelaram a existência de testículo do tipo lobular irrestrito.
- ✓ A espermatogênese em *C. kelberi* é do tipo cística, com células germinativas em desenvolvimento, parcialmente, sincrônico no interior de cada cisto.
- ✓ A ultraestrutura da espermiogênese de *C. kelberi* é similar a observada para os outros representantes do gênero *Cichla* descritos em literatura, e assim como a maioria dos teleósteos, apresenta o tipo básico de espermatozóide, conhecido como “aquasperma” uniflagelado anacrossomal.