

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**MORFOLOGIA TESTICULAR E ESTRUTURA DA ESPERMATOGÊNESE EM
PEIXES ORNAMENTAIS**

Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*; Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon*

bifasciatus* e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques

(Teleostei, Characiformes)

CAMILO ALBERTO PRIETO MOJICA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aqüicultura.

**Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2007**

P949m Prieto Mojica, Camilo Alberto
Morfologia testicular e estrutura da espermatogênese em peixes ornamentais Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*; Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques* (Teleostei, Characiformes) / Camilo Alberto Prieto Mojica. -- Jaboticabal, 2007
iv, 76 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2007

Orientador: Carlos Alberto Vicentini

Banca examinadora: Laura Satiko Okada Nakaghi, Silvana Martinez Baraldi Artoni, Maria Terezinha Siqueira Bombonato, Sérgio Fonseca Zaiden

Bibliografia

1. Espermatogênese. 2. Peixes Ornamentais. 3. Estrutura testicular. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.3.03

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DEDICATORIA

Dedico a realização deste trabalho aos meus pais, **Julio Abel** e **María Fanny** pelo apoio oferecido, pela força e coragem que me deram para vencer as grandes dificuldades que tive para chegar até aqui.

Aos meus irmãos, **Andrea del Pilar** e **José Ignacio**, pelo apoio, carinho e amor recebidos durante este tempo longe da família.

À minha avó, "**Mamá Trina**", sempre lutando pelo amor à vida, há melhor coisa por que lutar?

Ao eterno "**Patojo**" (**Carlitos**), sempre iluminando o meu caminho.

"A gratidão é o único tesouro dos humildes."
(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP) – Campus de Jaboticabal – SP (Brasil), pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do CAUNESP, por possibilitar o crescimento acadêmico e intelectual na área de aqüicultura.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini, pela oportunidade, confiança e amizade a mim concedidos para a execução deste trabalho e também pelo grande exemplo de profissionalismo. *“Mais importante que adquirir uma grande sabedoria é a humildade na hora de transmiti-la.”* (Autor desconhecido)

Aos membros da Banca examinadora: Profa. Dra. Maria Terezinha Siqueira Bombonato, Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni, Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi e ao Prof. Dr. Sérgio Fonseca Zaiden pelas valiosas sugestões para enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes, e à CAPES que me concederam uma bolsa de estudo durante parte da realização deste trabalho, o que foi fundamental.

À Profa. Dra. Maria Célia Portella, pela disponibilidade de utilização dos equipamentos junto ao Laboratório de Nutrição e Larvicultura de Organismos Aquáticos do CAUNESP – Jaboticabal.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu – UNESP, pelo processamento do material e pela disponibilidade de utilização dos equipamentos para análise ultraestrutural.

Aos funcionários do CAUNESP, Veralice, Fátima, D. Ana, Suerli, Sylvia, Mauro, Mauricio, Márcio Reche, Márcio Alves, Valdecir, Roberto, Elisandra, Mônica, Donizete, pelo convívio, prontidão e amizade.

À Profa. Dra. Marta Verardino De Stéfani, pela disponibilidade de utilização das instalações do Laboratório de Ranicultura do CAUNESP para a manutenção dos peixes e para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Aristides M. Figueiredo Junior, pela consecução dos peixes utilizados neste trabalho.

À Regina L. Paulino, Rê, obrigado pela paciência e pelo convívio durante o primeiro ano do meu Doutorado, você é uma pessoa maravilhosa que merece o melhor da vida.

A todos os Professores que ministraram disciplinas junto ao Programa de Pós – Graduação do CAUNESP, por compartilharem conhecimentos e experiências.

Aos meus colegas: Antonio Francisco, Eduardo Abimorad, Daniela Castellani, Eduardo Onaka, Fabiana Garcia, Mariana C. Araújo, Nilton Ishikawa, Leonardo Takahashi, Fabiano Bendhack e Ana Paula Baldan, Michelle Vetorelli e Laurindo Rodrigues, Cristiane Meldau (Cris), Elissandra (Elis), Érico Takahashi, Marcio Hoshiba, Alessandra Messias, Junior e Ana Laura, Mari e Casé, que direta ou indiretamente apoiaram e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, e cada um a sua maneira, souberam me ajudar a crescer principalmente como pessoa.

As meninas da Republica ZOONA, pelos belos momentos compartilhados neste tempo.

Ao Jaime Fenerick Junior, pelas longas conversações nas viagens de Jaboticabal para Bauru, grande colega e amigo. Obrigado.

Aos Colombianos que residem e residiram em Jaboticabal, por ajudar a não se esquecer da nossa Colômbia.

Ao John Alejandro Clavijo, pela disposição, paciência e ajuda na consecução das fotografias junto ao Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária - ESALQ – Piracicaba-SP.

À Adriana Fernandes de Barros, amiga e colega. Dri, muito obrigado!

Agradeço especialmente a Ana Isabel Sanabria e Miguel Angel Landines, pela ajuda e amizade oferecida sempre. Muito Obrigado!.

À Karina Ribeiro, Luciene Patrici Papa e ao Bruno, pela ajuda no processamento do material junto ao Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências do Câmpus de Bauru – UNESP.

Ao Marcelo Tesser “Ogrão”, Rodrigo Takata “Cabeção”, Luis Fernando Bellam Fedrizi “Zé”, Karina Ribeiro “Ká” e ao Thiago Salgado “Siri”, grandes amigos e colegas, Muito Obrigado Mesmo!. *Os amigos verdadeiros são aqueles que vêm compartilhar a nossa felicidade quando os chamamos, e a nossa desgraça sem serem chamados. (Demetrio de Falera)*

À turma do futebol de toda quarta-feira, Siri, Franco, Fernando, Kuva, Branco, Érico, Gimenez, “Sapinho”, Léo, Pernambuco.... Vou sentir muitas saudades dos nossos jogos.

A Deus, por tudo

A todos aqueles que de alguma forma participaram de minha formação e sempre me incentivaram na minha Carreira Universitária, aqui omitidos, porém não esquecidos. A todos MUITO OBRIGADO!.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
LITERATURA	11
1. Morfologia testicular	12
2. Estrutura testicular e características das células germinativas	12
3. Espermatogênese em teleósteos	14
4. Características ultraestruturais das células germinativas	15
5. Espermio gênese em teleósteos	17
6. Características dos espermatozoides.....	18
7. Características das células de Sertoli.....	21
8. Morfometria.....	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
1. Local do estudo.....	25
2. Animais e amostragem.....	25
3. Microscopia de luz	26
4. Análise ultraestrutural da espermatogênese	26
a. Microscopia Eletrônica de Varredura	26
b. Microscopia Eletrônica de Transmissão	28
5. Morfometria.....	28
6. Análise estatística	29
RESULTADOS	30
Morfologia geral dos testículos	31
1. Características anatômicas dos testículos	31
2. Características histológicas dos testículos	32
3. Células germinativas	33
3.1. Espermatogônias primárias	33
3.2. Espermatogônias secundárias	33
3.3. Espermátocitos primários	33
3.4. Espermátocitos secundários	34
3.5. Espermátides	34
3.6. Espermatozoides	34

4. Características ultraestruturais da espermatogênese	34
5. Características ultraestruturais da espermiogênese	36
6. Características dos espermatozoides	38
7. Características das células de Sertoli	38
8. Morfometria	39
DISCUSSÃO	51
1. Características anatômicas dos testículos	52
2. Espermatogênese	52
3. Características ultraestruturais das células germinativas	53
4. Espermiogênese	55
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo descrever a morfologia testicular e as características da espermatogênese e a estrutura dos espermatozóides em *Gymnocorymbus ternetzi*, *Hyphessobrycon bifasciatus* e *Hyphessobrycon eques*. Fragmentos de testículo foram retirados e submetidos às técnicas de rotina para microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Verificou-se que nas três espécies a distribuição das espermatogônias nos túbulos seminíferos corresponde ao tipo espermatogonial irrestrito. A espermatogênese nas três espécies segue um padrão cístico. Todas as células da linhagem espermatogênica foram observadas nas três espécies estudadas: espermatogônias primárias e secundárias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes e espermatozóides. A morfologia dessas células segue o padrão descrito na literatura para os teleósteos e elas são reconhecidas principalmente pelo tamanho do núcleo, que diminui gradativamente, à medida que aumenta o grau de condensação da cromatina. As espermatogônias primárias apresentam um nucléolo e mitocôndrias agrupadas e associadas com corpos densos ou “nuages”. As espermatogônias, espermatócitos e espermatídes unidas por pontes citoplasmáticas, se encontram dentro de cistos delimitados por prolongações das células de Sertoli. Os espermatozóides de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* apresentam cabeça com núcleo esférico, sem acrossoma, peça intermediária e um único flagelo, fossa nuclear presente alojando o complexo centriolar e presença de canal citoplasmático. Este trabalho contribui ao conhecimento das características morfológicas e funcionais dos espermatozóides, como ferramenta importante para o estudo básico da biologia reprodutiva e para a produção em cativeiro de qualquer destas espécies ícticas, assim como, para o desenvolvimento de técnicas dirigidas à conservação de espécies nativas e sua aplicabilidade potencial nas análises filogenéticas em diferentes grupos de peixes.

Palavras-chaves: Espermatogênese, peixes ornamentais, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Hyphessobrycon eques*, estrutura testicular.

ABSTRACT

The main purpose of this study was to describe the testicular morphology and the characteristics of spermatogenesis and spermatozoa structure of *Gymnocorymbus ternetzi*, *Hyphessobrycon eques* and *Hyphessobrycon bifasciatus*. Testicular fragments were collected to conventional methodologies at optical microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. It was verified that spermatogonial organization of the seminiferous tubules in *G. ternetzi*, *H. eques* and *H. bifasciatus* belonged to the unrestricted spermatogonial type of fish testis. All the studied species had a cystic pattern of the spermatogenesis process. All the cells of the spermatogenical lineage were observed in the three species: primary and secondary spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa. The morphology of those cells follows the described pattern in the literature for most of teleosts and they are mainly recognized by the size of the nucleus, which become smaller as chromatin condenses. Characteristically, primary spermatogonia have a single nucleolus and grouped mitochondria associated with dense bodies or nuage. Spermatogonias, spermatocytes and spermatids are joined by cytoplasmatic bridges and are confined within spermatocysts surrounded by cytoplasmic processes of Sertoli cells. *G. ternetzi*, *H. eques* and *H. bifasciatus* spermatozoa have a spherical head, no acrosome, and possess a midpiece consisting of basal body, which produces a flagellum. The nuclear fossa contain the centriolar complex. The cytoplasmic canal is observed. This study help to knowledge of the morphological and physiological sperm features, important tool for the basic study of the biology and artificial reproduction of fishes, as well as, to develop techniques to conservation and phylogenetical studies in several fish groups

Key words: spermatogenesis, ornamental fish, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Hyphessobrycon eques*, testicular structure

INTRODUÇÃO GERAL

A maior parte da produção mundial em aquicultura é dedicada à produção de alimento, no entanto, a produção de peixes ornamentais é um componente importante da indústria da aquicultura em vários países (Tlusty, 2002). Este mercado e o de produtos para a aquariorfilia é uma atividade consolidada, que movimenta por ano cerca de 500 milhões de dólares (OFI, 2003), sendo de grande importância econômica em muitas regiões, principalmente nos países em desenvolvimento (Andrews, 1990; Cheong, 1996; Chapman *et al*, 1997; Bartley, 2000).

No mundo, cerca de 350 a 400 milhões de peixes ornamentais são comercializados por ano, sendo 70% destes produzidos em cativeiro (Chao *et al.*, 2001), movimentando 278 milhões de dólares por ano (FAO, 2005). Isto faz com que surja interesse no desenvolvimento de métodos para produção de novas espécies de água doce (Tlusty, 2002).

O cultivo de peixes ornamentais pode ajudar a diminuir o impacto da captura de animais do meio ambiente, minimizando possíveis conflitos com ambientalistas, além disso, a aquicultura contribui para que a demanda dos mercados seja principalmente estabelecida com produtos provenientes de cultivo (Tlusty, 2002).

Nos Estados Unidos a produção de peixes ornamentais é o quarto maior setor da produção total de aquicultura, depois da indústria do catfish, truta e salmão. É um proeminente setor mesmo representando apenas 7% do total de produção da aquicultura (JSA, 1999). O interesse na produção de peixes ornamentais nos Estados Unidos tem aumentado desde 1985, sendo a Florida o Estado que produz aproximadamente 80% do total da produção Norte-Americana (FASS, 1999). Neste país, a maior parte desta produção concentra-se em espécies de água doce, das quais aproximadamente 90% são cultivadas em cativeiro (Dawes, 1998).

O Brasil é um país reconhecido como exportador de peixes ornamentais, tendo iniciado as atividades na década de 1970. Cerca de 28 a 65 milhões de peixes foram exportados durante os anos de 1998 a 2003, da região de Barcelos, Amazonas (Chao e Marcon, 2003).

No Brasil, mesmo com ampla área geográfica e muitas bacias hidrográficas, o comércio de peixes ornamentais está restrito à região do Amazonas (Bacias do Rio Negro e Xingu, principalmente). Essa área mantém uma das maiores diversidades de peixes existentes no mundo, com muitas espécies consideradas ornamentais (Chao, 2001).

No Estado do Amazonas, essa indústria aporta 60% da economia local (Chao e Prang, 1997; Dowd e Tlusty, 2000). Mais de 20 milhões de peixes vivos são exportados anualmente da região, gerando cerca de três milhões de dólares para a economia do Estado (Chao *et al.*, 2001).

Porém, esses benefícios econômicos normalmente são derivados da indústria da captura, principalmente no rio Amazonas (Norte do Brasil) causando sérios impactos ambientais (Chao *et al.*, 2001; Tlusty, 2002; Halachmi, 2006).

A Bacia do Rio Paraná, é considerada a segunda maior bacia de América do Sul, também com uma notável ictiofauna (Agostinho e Julio, 1999), 42,6% das espécies desta Bacia apresentam potencial para ser utilizadas no comércio de peixes ornamentais (Pelicice e Agostinho, 2005).

A Ordem Characiformes é um dos grupos principais dentro dos peixes neotropicais de água doce, composta por 18 famílias, com cerca de 270 gêneros e aproximadamente 1674 espécies descritas. Caracterizam-se por possuir dentes bem desenvolvidos, nadadeira adiposa usualmente presente, corpo quase sempre coberto de escamas, nadadeira pélvica presente, nadadeira anal curta a moderadamente longa, linha lateral usualmente curvilínea, às vezes, incompleta. A mandíbula superior não protraída, dentes faríngeos freqüentemente presentes. Os membros desta Ordem são freqüentemente pequenos e a maioria apresenta cores chamativas, característica importante para ser utilizados como peixes ornamentais (Nelson, 2006).

Dentro desta Ordem, encontram-se os peixes correspondentes aos gêneros *Hyphessobrycon* e *Gymnocorymbus*, comumente identificados pela presença da nadadeira adiposa, linha lateral incompleta, boca com duas séries de dentes premaxilares e o formato dos dentes não necessariamente cônicos, com as escamas preventrais organizadas em mais de uma fileira, e sem escamas na nadadeira caudal (Eigenmann, 1917; Géry, 1977) (Tabela 1).

O gênero *Hyphessobrycon* apresenta aproximadamente 65 espécies e faz parte dos chamados “Tetras Americanos”, peixes utilizados no comércio de ornamentais, destacando-se pela diversidade de formas, cores brilhantes, comportamento pacífico e pelo seu tamanho, geralmente pequeno (Berra, 2001).

Tabela 1. Classificação zoológica das espécies *Gymnocorymbus ternetzi*, *Hyphessobrycon bifasciatus* e *Hyphessobrycon eques*, pertencentes à Ordem Characiformes

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Classe:	Actinopterygii
Ordem:	Characiformes
Família:	Characidae
Espécies Utilizadas:	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i> <i>Hyphessobrycon bifasciatus</i> <i>Hyphessobrycon eques</i>

O *Gymnocorymbus ternetzi* (Boulenger, 1895), comumente conhecido como tetra negro é comum em climas subtropicais, com temperaturas entre 20 a 26 °C, tamanho máximo de 6,0 cm de comprimento total, é um peixe bastante ágil, resistente e de comportamento pacífico que habita principalmente nas superfícies dos corpos d'água, alimentam-se de vermes, pequenos crustáceos e insetos (Lima *et al.*, 2003).

O *Hyphessobrycon bifasciatus* (Ellis, 1911), conhecido popularmente como tetra amarelo, originário do Brasil, é comum desde o Espírito Santo ao Rio Grande do Sul, e na bacia do Rio Paraná. Sua alimentação é de tipo onívora, principalmente, crustáceos e plantas. Espécie de pequeno porte alcançando 4,4 cm nos machos e 3,7 cm nas fêmeas; apresenta comportamento pacífico e encontram-se em ambientes bentopelágicos, com pH entre 5,8 e 8,0, e temperaturas de 20 – 25 °C. Cabe destacar, que também são muito importantes no comércio de peixes ornamentais (Robins, *et al.*, 1991).

Outra espécie de importância econômica é o Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882), espécie de comportamento gregário que se posiciona perto da superfície entre as hastes de plantas de emersão. Encontrados frequentemente em águas estagnadas. Alimentam-se de vermes, crustáceos, insetos e plantas. Seu modo reprodutivo é ovíparo. Esta espécie faz parte de um complexo de tetras “sanguíneos”, híbridos produzidos facilmente por produtores, e que são oferecidos geralmente no comércio de aquários (Weitzman e Palmer, 1997).

As estratégias reprodutivas em peixes ornamentais são complexas, e a maioria não são bem entendidas. No entanto, protocolos de reprodução em espécies de algumas famílias, incluindo a família Characidae, são praticados sem se conhecer aspectos morfológicos da espermatogênese e espermiogênese (Gwo *et al.*, 2005).

Apesar de alguns autores terem realizado estudos sobre a ultraestrutura das células germinativas, em diferentes grupos de peixes (Billard, 1984; Selman e Wallace, 1986; Van Winkoop *et al.*, 1992; Thiaw *et al.*, 1995; Stoumboudi e Abraham, 1996; Grandi e Colombo, 1997; Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999), são poucos os trabalhos de espermatogênese dentro da família Characidae (Romagosa *et al.*, 1999, Cunha Negrão *et al.*, 2002; Batlouni *et al.*, 2006), e a maioria descreveram ou documentaram as características dos espermatozoides pertencentes a esta família (Burns *et al.*, 1998; Aires *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2001; Vicentini, 2002; Cruz-Landim *et al.*, 2003; Gusmão-Pompiani, 2003; Veríssimo-Silveira *et al.*, 2006; Javonillo *et al.*, 2007), não sendo encontrados trabalhos deste tipo com as espécies *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*.

Estudos sobre as várias espécies de peixes têm mostrado que o processo de espermiogênese, os tipos de espermatozóides, assim como as estruturas espermáticas, são usualmente conservados nos membros de uma mesma família ou subfamília, e podem apresentar sinais filogenéticos (Mattei, 1991). No entanto, a comparação das características ultraestruturais da espermiogênese é bastante variável dentro da ordem Characiformes e muitas vezes dentro da própria família (Veríssimo-Silveira, 2007).

Cabe destacar, que o conhecimento da ultraestrutura dos espermatozóides e em geral da espermatogênese em peixes, é importante não só para estudos filogenéticos e de sistemática, como para aplicações práticas relacionadas à fertilização artificial e preservação de sêmen (Billard, 1978; Suquet *et al.*, 1998).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia testicular e a estrutura da espermatogênese em três espécies pertencentes à Ordem Characiformes (Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*, Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques*), utilizadas no comércio de peixes ornamentais.

LITERATURA

1- Morfologia testicular

Os testículos de peixes teleósteos que apresentam fecundação externa se caracterizam predominantemente como órgãos alongados pares, de coloração esbranquiçada, situados no celoma, cobertos por uma fina camada de tecido conjuntivo (túnica albugínea), ventralmente aos rins e dorsalmente ao canal alimentar. Os testículos mostram-se individualizados em toda a sua extensão, podendo se unir a extremidade caudal para formar o ducto espermático comum, que se abre na papila urogenital. A superfície das gônadas é lisa, sendo os seus volumes, formas e colorações variáveis com o desenvolvimento gonadal (Alexandrino *et al.*, 1985; Lima *et al.*, 1986; Patzner, 1991; Grier, 1993; Lahnsteiner *et al.*, 1994).

Os ductos espermáticos, em peixes teleósteos, apresentam arranjos morfológicos variáveis nas diferentes espécies, de acordo com os modelos descritos por Grier *et al.* (1980) e Lahnsteiner *et al.*, (1994). De modo geral, os ductos espermáticos são formados a partir de um ducto testicular principal, em cada testículo, o qual recebe os túbulos seminíferos primários ou secundários com comportamentos anastomótico ou ramificado, peculiar às espécies que apresentam arranjo morfológico testicular espermatogonial irrestrito (Grier *et al.*, 1980; Selman e Wallace, 1986; Grier, 1993). Em curimatá (*Prochilodus scrofa*), o ducto testicular principal se exterioriza, no pólo caudal do testículo, continuando-se como ducto espermático. Este último, se funde com o ducto espermático do lado oposto para se abrir na papila urogenital (Vicentini *et al.*, 2001).

2- Estrutura testicular e características das células germinativas

Estudos morfológicos foram realizados no sentido de descrever a espermatogênese de diferentes espécies de peixes teleósteos. Dentre os trabalhos clássicos e pioneiros encontram-se os estudos de Turner (1919), Geiser (1922 e 1924), Hann (1927), Vaupel (1929), Jones (1940), Mendonça (1943) e James (1946). Trabalhos posteriores foram realizados com o intuito de esclarecer alguns aspectos característicos da espermatogênese e alguns autores indicaram que a

espermatogênese ocorria dentro de “lóbulo”, enquanto que outros se referiam a “túbulos seminíferos”.

Grier *et al.*, (1980), estudando quatro ordens de teleósteos: Salmoniformes, Cipriniformes, Perciformes e Atheriniformes, contribuíram com outra nomenclatura para o sistema reprodutor masculino em peixes. Segundo estes autores, foi possível observar dois tipos estruturais distintos de testículos, os quais se diferenciam fundamentalmente na distribuição intratubular das espermatogônias. No tipo “espermatogonial irrestrito”, as espermatogônias se localizam ao longo de todo o túbulo seminífero e geralmente estão associadas à membrana basal. Este padrão estrutural foi observado nos exemplares das ordens Salmoniformes, Perciformes e Cipriniformes, semelhante ao observado em testículos de mamíferos e na maioria de teleosteos (Grier, 1981). Na ordem Atheriniformes, o testículo se apresenta como “espermatogonial restrito”, no qual as espermatogônias se localizam exclusivamente na extremidade cega dos túbulos seminíferos, como foi observado também em *Gambusia affinis* (Fraile *et al.*, 1992). Em ambos os tipos de testículos, o desenvolvimento das células germinativas se produz de maneira sincrônica, dentro de cistos espermatogênicos delimitados por prolongações citoplasmáticas das células de Sertoli (Grier *et al.*, 1980).

Grier, em 1992, reavaliando a estrutura testicular dos cordados propôs a hipótese da matriz extracelular para explicar uma provável evolução do compartimento germinativo. Segundo o autor, a estrutura testicular é bem definida nos amniotas (répteis, aves e mamíferos) estando dividida em compartimentos intratubular (ou germinativo) e intertubular (ou intersticial), separados entre si por membrana basal. Entretanto, existe uma diversidade muito grande na morfologia testicular entre classes e entre indivíduos da mesma classe de cordados anamniotas (urocordados, cefalocordados, agnatas e elasmobrânquios, peixes e anfíbios), de tal forma que são fundamentais estudos histológicos e ultraestruturais para o melhor entendimento das diferentes características testiculares.

Com base na forma do compartimento germinativo, os testículos dos vertebrados podem ser de três tipos: tubular, tubular anastomosado e lobular (Grier, 1993). O tipo tubular, típico dos amniotas, é constituído por túbulos, que apresentam

uma luz e não terminam na periferia do testículo e sim formam uma alça com as duas extremidades dos túbulos conectadas a um sistema de ductos (Grier, 1993). No tipo tubular anastomosado, o compartimento germinativo forma uma alça na periferia do testículo e apresenta um sistema de túbulos anastomosados contínuo desde a periferia até o ducto testicular. Este tipo é característico dos teleósteos mais primitivos (Grier, 1993; Pudney, 1995). No testículo lobular, o compartimento germinativo termina em fundo cego e tem a forma de uma “estrutura arredondada”, sendo característicos dos teleósteos “superiores”, como os Perciformes e os Atheriniformes (Grier, 1993; Loir, et al. 1995; Pudney, 1995).

3- Espermatogênese em teleósteos

Em termos da cinética da espermatogênese, o desenvolvimento das células germinativas se produz de maneira sincrônica no interior de cistos germinativos, delimitados pelas células de Sertoli (Grier *et al.*, 1980; Grier, 1992; Loir *et al.*, 1995; Pudney, 1995). As células germinativas de um cisto provenientes de uma única espermatogônia, são, portanto, isogênicas (clone de células germinativas) até o espermatócito primário pré-paquitênico. No paquíteno, através dos mecanismos de crossing over, a recombinação gênica ocorre e, por tanto, os espermatócitos primários pós-paquitênicos são geneticamente distintos e não constituem um clone (Lo Nostro *et al.*, 2003).

Segundo Mattei, *et al.*, (1993) foram observados ainda, dois tipos de espermatogênese em peixes teleósteos. O primeiro tipo compreende a espermatogênese de tipo cística, quando o desenvolvimento das células germinativas ocorre completamente dentro do cisto. Neste caso, as células germinativas estão ligadas por pontes citoplasmáticas, que se rompem ao final da espermiogênese, quando os espermatozóides são liberados no lúmen dos lóbulos ou túbulos seminíferos. Neste tipo de espermatogênese as células germinativas apresentam diferenciação sincrônica e as células de Sertoli são as encarregadas de transportar metabólitos para as células germinativas (Griswold, 1988).

Na espermatogênese semicística, os cistos germinativos se abrem antes do final da espermatogênese, a qual é completada no lúmen dos lóbulos ou túbulos

seminíferos. A distribuição de metabólitos acontece no lúmen dos lóbulos ou túbulos, para as células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento fora dos cistos germinativos (Griswold, 1988). As pontes citoplasmáticas existentes entre as células germinativas se rompem, quando elas são liberadas dentro do lúmen dos lóbulos ou túbulos. Este processo ocorre nos mais diversos estágios da espermatogênese. O rompimento dos cistos germinativos, nos diferentes níveis de diferenciação das células germinativas, segundo Mattei *et al.*, (1993), leva a uma mistura dos diferentes tipos de células germinativas no lúmen lobular, criando um mecanismo de espermatogênese assincrônica.

De acordo com Paniagua *et al.*, (1997), a espermatogênese é um processo muito similar em todo o reino animal, apesar da organização das células germinativas ser muito variada no interior do testículo. Por outro lado, apesar dos diferentes tipos de células germinativas serem praticamente os mesmos em todas as espécies, as características citológicas variam de espécie para espécie. Basicamente, a espermatogênese nos teleósteos pode ser dividida nas seguintes etapas: proliferação das espermatogônias, divisão meiótica, espermiogênese e espermição (Miura, 1999).

4- Características ultraestruturais das células germinativas

Alguns estudos morfológicos têm sido realizados no sentido de descrever as características morfológicas das células germinativas, nos períodos iniciais da espermatogênese de peixes em geral (Clerot, 1976; Grier, 1981; Selman e Wallace, 1986; Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999, Cruz-Landim *et al.*, 2003). As espermatogônias representam as células tronco do epitélio seminífero, e sua origem é controversa em teleósteos. Alguns autores afirmaram que a renovação das espermatogônias é feita por divisão de células migratórias extratesticulares (Turner, 1919; Rastogi, 1968), ou ainda que aquelas se originam de células migratórias localizadas no espaço intertubular seminífero (Jones, 1940; Srivastava, 1967). As espermatogônias podem se originar, ainda, a partir do estoque de células germinativas indiferenciadas primárias, situadas no espaço intertubular (Ruby e Mc Millan, 1970; Shanbrag e Nadkarni, 1979; Alexandrino *et al.*, 1985).

Ultraestruturalmente, as espermatogônias primárias são as maiores células do testículo, seu núcleo é esférico, apresentando cromatina granular e uniformemente distribuída; nucléolo proeminente, esférico e elétron-denso. O citoplasma contém mitocôndrias esféricas com poucas cristas, ribossomos livres, retículo endoplásmico liso e granular, e um sistema bem desenvolvido de membranas duplas, perfuradas por uma seqüência de poros, com oito a dez cisternas, conhecidas como “lamellae annulata” (Romagosa *et al.*, 1999; Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999).

As espermatogônias apresentam também uma estrutura elétron-densa no citoplasma denominada cimento intermitocondrial, o qual geralmente está associado a grupos de mitocôndrias (Tourey *et al.* 1977; Romagosa *et al.*, 1999; Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999; Zaiden, 2000). As espermatogônias primárias se dividem por mitose e dão origem às espermatogônias secundárias, que inicialmente se apresentam muito similares às células mãe, a exceção do núcleo que se apresenta ligeiramente menor. As espermatogônias primárias e secundárias são visualizadas durante o ciclo reprodutivo, e podem ser observadas fora dos cistos.

Em seqüência, as espermatogônias secundárias sofrem mitose e originam os espermatócitos primários, que são visualizados nas diversas fases da prófase meiótica. Estas células apresentam núcleo central com forma regular ocupando grande parte da célula. O nucléolo não é visível e freqüentemente se observam massas cromossômicas denominadas de complexos sinaptonêmicos (Romagosa, 1991; Romagosa *et al.*, 1999; Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999). Os espermatócitos secundários, que se originam a partir da primeira divisão meiótica dos espermatócitos primários, apresentam núcleos evidentes, excêntricos e com cromatina distribuída irregularmente, o citoplasma apresenta numerosas nuages e mitocôndrias concentradas no polo oposto ao núcleo, porém, cistos de espermatócitos secundários são raramente observados (Romagosa *et al.*, 1999; Shahin, 2006).

5- Espermiogênese em teleósteos

A seguir, tem início o processo de espermiogênese, que representa a parte pós-meiótica da espermatogênese, e envolve um processo complexo de diferenciação celular das espermatídes em espermatozóides (Plöen e Courtens, 1986). Os cistos de espermatídes, em diferentes estágios de maturação, ocorrem ao longo dos túbulos seminíferos. Esta distribuição foi ressaltada por vários autores em diferentes espécies de teleósteos (Billard, 1970; Grier *et al.*, 1980; Gusmão *et al.*, 1999; Romagosa *et al.*, 1999; Veríssimo-Silveira, 2007).

Segundo Mattei (1970) existem dois tipos de espermiogênese (tipo I e tipo II). Na espermiogênese do tipo I, a espermatíde jovem apresenta núcleo esférico central, mitocôndrias esparsas pelo citoplasma e complexo centriolar lateral ao núcleo e preso à membrana plasmática; o centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e tem início o desenvolvimento de um flagelo lateral. O complexo centriolar movimenta-se em direção ao núcleo, arrastando a membrana citoplasmática e o segmento inicial do flagelo, formando deste modo, o canal citoplasmático, um espaço entre a membrana e o flagelo. No contorno nuclear, próximo ao segmento inicial do flagelo, se forma uma depressão, denominada de fossa nuclear. O núcleo sofre uma rotação de 90° em relação ao eixo flagelar e o complexo centriolar se insere na fossa nuclear, que determina a região basal do núcleo. Na espermiogênese do tipo II, a ausência da rotação nuclear faz com que o eixo flagelar permaneça paralelo ao núcleo e embora a fossa nuclear se forme, e esteja presente no espermatozóide, o complexo centriolar permanece fora dela (Jamieson, 1991).

Durante a diferenciação das espermatídes, ou espermiogênese, ocorre a compactação do conteúdo nuclear, a formação da peça intermediária e o desenvolvimento do flagelo. Ao final da espermiogênese, as pontes citoplasmáticas e o citoplasma residual são eliminados para o interior dos cistos germinativos, posteriormente fagocitados pelas células de Sertoli, e os processos citoplasmáticos das células de Sertoli se afastam (Grier, 1992; Selman e Wallace, 1986; Schulz e Miura, 2002).

Billard (1983), estudando o processo de espermiogênese da truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), observou quatro estágios espermatogênicos. As espermátides redondas, visualizadas no primeiro e segundo estágios, apresentaram inicialmente núcleo com cromatina heterogênea e, mais tarde, aspecto homogêneo. No terceiro estágio de maturação, a cromatina iniciou a fase de condensação, formando grânulos elétron-densos. No quarto estágio, a cromatina se apresentou com aspecto fibrilar. Entretanto, Cruz-Landim e Cruz-Höfling (1986; 1987), descreveram para o tucunaré (*Cichla ocellaris*) o amadurecimento das espermátides em cinco estágios de maturação, onde, nos estágios finais, o núcleo sofre a alteração morfológica mais intensa, apresentando aspecto riniforme.

Em *Gambusia affinis*, Fraile *et al.*, (1992), descreveram o processo de espermiogênese, evidenciando quatro estágios de maturação. No primeiro estágio, o núcleo redondo das espermátides se assemelhou ao núcleo dos espermatócitos secundários. No segundo estágio, o núcleo apresentou mudanças na forma, passando a exibir um aspecto de ferradura e cromatina bastante condensada. No terceiro estágio, o núcleo se assemelhou a uma ponta de seta, com a cromatina ainda mais condensada, e passando para o quarto estágio, na fase de espermátide madura, adquiriu alongamento e condensação máxima de cromatina.

Após a espermiogênese, as paredes dos cistos germinativos se abrem e liberam os espermatozóides (espermição), dependendo da espécie, os espermatozóides podem ser armazenados na luz dos túbulos, nos ductos eferentes ou em vesículas seminais. Grupos de espermatozóides podem ser empacotados por substâncias produzidas nas células de Sertoli (espermatóforos), os quais são liberados no momento da fertilização, em espécies que apresentam fertilização interna (Schulz e Miura, 2002).

6- Características dos Espermatozóides

Na maioria dos peixes teleósteos a fertilização é externa. Em número menor, algumas espécies apresentam fertilização interna, com os machos possuindo um órgão copulador (gonopódio) com o qual deposita o esperma diretamente no trato reprodutivo da fêmea através da papila urogenital (Nakatani *et al.*, 2001). Burns *et*

al., (2002) consideram inadequado o uso do termo fertilização interna, e sugeriram que ele seja substituído por inseminação, uma vez que o tempo exato entre a introdução do esperma e a fertilização propriamente dita não é conhecido até o momento para nenhuma espécie de Ostariophysii, que exhibe esse modo de reprodução.

Dependendo da estrutura, organização celular e tipo de fertilização, as células germinativas masculinas podem ser classificadas como primitivas ou modificadas. Os espermatozoides primitivos ocorrem nos grupos com fertilização externa e, portanto, são liberados no meio aquático. Estes se caracterizam por apresentar acrossoma, núcleo esférico, dois centríolos (o centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal formando o axonema), poucas mitocôndrias arredondadas são observadas na peça intermediária e o flagelo apresenta o complexo axonemal clássico formado por nove duplas de microtúbulos periféricos e um par central (Franzè, 1970).

Estudos comparativos da morfologia dos espermatozoides de peixes teleostes permitiram distinguir três categorias de espermatozoides, de acordo com a sua forma e seu grau de evolução. O primeiro tipo é constituído de espermatozoides, como os da carpa, pouco elaborados, com núcleo esférico, mitocôndrias e citoplasma confinados na parte posterior da cabeça, sem formação de uma peça intermediária verdadeira. O segundo tipo é constituído de espermatozoides, como os da truta, com cabeça ligeiramente alongada e peça intermediária na sua parte posterior, formada por um colar de mitocôndrias, que às vezes encontram-se fundidas. O terceiro tipo, representado pelos espermatozoides de lebetes, apresentando cabeça muito alongada, simetria bilateral, mitocôndrias organizadas na parte posterior da cabeça, constituindo a peça intermediária (Billard, 1970). Pode-se considerar este terceiro tipo como o mais elaborado ou o que possui maior vantagem adaptativa, assim como a modificação em sua morfologia está relacionada com o seu modo de fertilização interna (Jones e Butler, 1988).

Jamieson (1991), sugeriu uma classificação para os espermatozoides de peixes em *aquasperm* e *introsperm*, para designar, respectivamente, os espermatozoides dos peixes com fertilização externa, liberados no meio aquático, e os dos peixes de fertilização interna, liberados diretamente no trato reprodutivo da fêmea. O autor

ainda estende esta classificação considerando também a presença ou a ausência do acrossoma e o número de flagelos no espermatozóide. Com isso, tem-se no caso do *aquaesperm*, o tipo *acrosomal aquaesperm* ou o *anacrosomal aquaesperm*. Este último subdivide-se em *uniflagellate*, *biflagellate* ou *aflagellate*. Com relação ao *introsperm* há o *acrosomal introsperm* ou o *anacrosomal introsperm* e este pode ainda ser *simple* ou *complex*.

Jamieson (1991) considera que o espermatozóide encontrado na maioria dos Neopterygii corresponde a um típico *anacrosomal aquaesperm uniflagellate*, o qual apresenta, em geral, núcleo pequeno, ovóide ou esférico, sem acrossoma; os centríolos, em ângulos retos, situam-se na fossa nuclear quando esta se encontra presente, o centríolo distal se diferencia em corpúsculo basal desenvolvendo o axonema. A peça intermediária é pequena e forma um colar ao redor da região inicial do flagelo. As mitocôndrias são pouco numerosas e pequenas, situam-se no colar citoplasmático, separadas do início do flagelo por um espaço existente entre as membranas plasmática e flagelar, o canal citoplasmático. O flagelo apresenta o complexo axonemal clássico formado por nove duplas de microtúbulos periféricos e um par central. A membrana flagelar pode apresentar ou não 1, 2 ou 3 projeções laterais ou “fins” semelhantes às nadadeiras dos peixes (Jamieson, 1991; Mattei, 1991).

Em 1991, Mattei realizou um estudo sobre a ultraestrutura dos espermatozóides em peixes e suas implicações sistemáticas, acrescentando dados de cerca de 80 espécies, aos existentes até aquela data. Com base nas comparações realizadas entre os espermatozóides dos grupos analisados, o estudo de Mattei (1991) mostra que dois caracteres, considerados novos, foram encontrados nos Neopterygii: a redução no tamanho do núcleo e a perda do acrossoma, sendo esse último também evidenciado por Jamieson (1991). Segundo Mattei (1991), estas duas características associadas à presença de uma peça intermediária curta, ocorrendo já no Actinopterygii primitivo, e produzem um espermatozóide cuja estrutura simplificada é bastante similar à dos espermatozóides dos invertebrados aquáticos com fertilização externa, considerados como sendo do tipo primitivo por Franzèn (1970).

A maioria dos espermatozoides de peixes teleósteos com fertilização externa não apresentam acrossoma, e a ausência desta estrutura é compensada pela presença de uma micrópila, um orifício presente no córion dos ovos, que facilita a entrada dos espermatozoides nestas células, no processo de fertilização (Cosson *et al.*, 1999).

7- Características das células de Sertoli

As células de Sertoli se caracterizam por possuir núcleo grande, nucléolo proeminente e citoplasma com retículo endoplasmático não-granuloso, complexo de Golgi bem desenvolvido, além da presença de mitocôndrias, ribossomos livres, polisomas e vesículas de lipídio. Elas são encontradas no interior dos túbulos ou lóbulos seminíferos, sempre associadas às células da linhagem germinativa, formando a parede dos cistos espermatogênicos. No decorrer do ciclo reprodutivo, variam em número, forma e tamanho, e é possível que secretem sinais moleculares para dentro da luz dos cistos germinativos, como por exemplo, fatores de crescimento (Romagosa, 1991; Schulz e Miura, 2002).

As células de Sertoli possuem uma função importante no desenvolvimento das células germinativas, conseqüentemente, estas fornecem fatores necessários para a sobrevivência, proliferação e diferenciação, além de participarem do processo de fagocitose de células germinativas em decomposição (Weltzien *et al.*, 2004), bem como, de corpos citoplasmáticos residuais deixados por espermátides adultas no final da espermatogênese (Amann, 1993).

A espermatogênese é um processo complexo, coordenado por sinais parácrinos e endócrinos. Estes sinais são necessários para ajudar no desenvolvimento de quatro ou cinco camadas de células germinativas em diferentes estádios de mitose, meiose e espermiogênese dentro de cada região do túbulo seminífero. Em mamíferos, a espermatogênese, além de ser coordenada por sinais parácrinos e endócrinos, também é condicionada por junções do tipo “gap” (Roscoe *et al.*, 2001). As junções do tipo “gap” são constituídas de agregações de canais de membrana, chamadas “connexons”, quando juntadas com outras “connexons” de

células adjacentes, formam pontes intercelulares para a difusão de íons e moléculas pequenas (Beyer *et al.*, 1990).

As células de Sertoli também podem estar interconectadas por “tight junctions” localizadas em regiões basais dos túbulos seminíferos, formando uma barreira hemato-testicular funcional, em mamíferos, durante o processo de maturação, os espermatócitos que se originam das espermatogônias no compartimento basal do túbulo, deslocam-se através de “tight junctions” e terminam seu desenvolvimento no compartimento central do túbulo (Amann, 1993).

Em mamíferos, as interações celulares dentro dos testículos, são baseadas em elementos estruturais e fatores moleculares. Em teleósteos, principalmente, observa-se junções entre células de Sertoli, entre células de Sertoli e células germinativas, entre células germinativas, e entre células intersticiais (Loir *et al.*, 1995). Batlouni *et al.*, (2005), concluíram que, assim como em mamíferos, essas junções apresentam um papel importante na espermatogênese em peixes, pois elas conferem sustentação das células germinativas dentro dos cistos espermatogênicos.

Em *Poeciliidae* e em *Goodeidae*, as células de Sertoli, durante o processo de espermiogênese, se transformaram em células do epitélio de revestimento dos ductos eferentes (Grier *et al.*, 1978; Fraile *et al.*, 1992). Em outros casos tornam-se hipertróficas (Grier *et al.*, 1980) ou se degeneram (Billard, 1970) depois da espermição, e permanecem dentro do sistema de ductos eferentes, ou às vezes desaparecem durante a maturação final das espermátides (Grier e Linton, 1977).

Os lóbulos ou túbulos seminíferos se apresentam separados por tecido conjuntivo contendo fibroblastos, vasos sanguíneos e células de Leydig. As quais são importantes na produção de esteróides, para a regulação da espermatogênese, assim como para o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e comportamento sexual. (Weltzien *et al.*, 2004).

8- Morfometria

Em teleósteos, a espermatogênese se desenvolve em cistos localizados dentro dos túbulos seminíferos. Estes cistos são formados quando as células de Sertoli se associam com as espermatogônias primárias. Deixando de lado este arranjo cístico, no qual as células germinativas se desenvolvem sincronicamente, o processo de espermatogênese em teleósteos é muito parecido ao de mamíferos. No entanto, características específicas na eficiência espermatogênica podem ser encontradas para uma espécie em particular, e para isto dados quantitativos podem ser usados para entender melhor o processo da espermatogênese (França e Russell, 1998, Vilela, *et al.*, 2003).

A morfometria constitui-se de um conjunto de métodos com o objetivo de obter informações numéricas de estruturas macroscópicas ou microscópicas em termos de volume, área, número e tamanho de componentes, correlacionando-se a estrutura com a sua função (Nobrega, 2003), sendo uma ferramenta tradicionalmente utilizada nos estudos de espermatogênese de mamíferos, em especial de roedores, permitindo estimar o comprimento dos túbulos seminíferos, o número de células germinativas, assim como a eficiência espermatogênica (França e Russell, 1998).

A utilização da morfometria em situação experimental ou não, está permitindo uma melhor compreensão da histofisiologia e cinética das células germinativas nos teleósteos, constituindo-se em um novo instrumento na interpretação das gônadas dos peixes (Vilela *et al.*, 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

1- Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP) Campus de Jaboticabal – SP (Brasil), localizado a 21°15'22" de latitude sul, 48°18'58" de longitude oeste e a 595 m de altitude.

2- Animais e amostragem

Para o presente trabalho foram utilizados 15 exemplares machos e adultos (em maturação testicular e na fase de testículo maduro), de cada uma das seguintes espécies: Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi* (Peso = $1,95 \pm 0,15$ g, Comprimento total = $5,29 \pm 0,31$ cm) Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* (Peso = $1,22 \pm 0,34$ g, Comprimento total = $4,77 \pm 0,40$ cm) e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques* (Peso = $1,48 \pm 0,15$ g, Comprimento total = $4,57 \pm 0,10$ cm), (Figura 1). Os peixes foram obtidos de um produtor da região de Araraquara – SP. Eles foram acondicionados em caixas de amianto de 500 litros com renovação constante de água, mantendo assim, uma densidade de 1 peixe para cada 5 litros de água.

Dois exemplares de cada espécie Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*, DZSJRP 10.858, Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus*, DZSJRP 10.859 e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques*, DZSJRP 10.860, foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% para identificação e posterior depósito na coleção de peixes do Laboratório de Ictiologia - Departamento de Zoologia e Botânica da Universidade Estadual Paulista – UNESP Câmpus de São José do Rio Preto – SP.

Os peixes foram coletados mensalmente em lotes de três exemplares, no período de julho a novembro de 2006, perfazendo um total de quarenta e cinco animais, sendo quinze de cada espécie. Após coleta, os animais foram anestesiados com solução de benzocaína ($0,1 \text{ gr.L}^{-1}$ benzocaína), pesados, medidos, fotografados com máquina fotográfica Canon PowerShot A430 e posteriormente mortos por decapitação. Com auxílio de uma lupa Olympus modelo SZ2-ILST (Tokyo, Japan), os peixes foram dissecados para a retirada dos testículos localizados ventralmente aos rins e dorsalmente ao canal alimentar.

3- Microscopia de luz

Os testículos foram fixados em solução de Karnovsky modificada (2,5% de glutaraldeído, 2% paraformaldeído em solução tampão de fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,2) durante 24 horas (Karnovsky, 1965). Fragmentos foram desidratados em álcool em série crescente de concentração e incluídos em historesina. Os cortes de 2 a 5 µm foram obtidos em micrótomo equipado com navalha de vidro; distendidos em água e colocados sobre lâminas; levados para estufa a 37 °C por 24 horas e em seguida submetidos à coloração com Hematoxilina/Eosina (H/E) e Azul de Toluidina 1%. A análise e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio óptico Olympus modelo BX50 (Tokyo, Japan), junto ao Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências do Câmpus de Bauru-UNESP.

4- Análise ultraestrutural da espermatogênese

a) Microscopia Eletrônica de Varredura

Para estudos de microscopia eletrônica de varredura, testículos inteiros e fragmentos de tecidos testiculares foram fixados por imersão em solução de Karnovsky modificada. Após desidratação em seqüência crescente de soluções de acetona, o material foi secado obtendo-se o ponto crítico com dióxido de carbono líquido, em aparelho Balzers CPD-10 (Germany). As amostras foram montadas em pota espécimen *stubs*, para serem metalizadas com uma mistura coloidal de ouro-paládio em aparelho Balzers SCD-040 (Germany). O material foi analisado e fotodocumentado em microscópio eletrônico de varredura JSM 5410 (JEOL, Japan) e em Digital Scanning Microscope 940A (Zeiss, Germany), respectivamente junto ao Centro de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal – UNESP, e na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária - ESALQ – Piracicaba-SP.

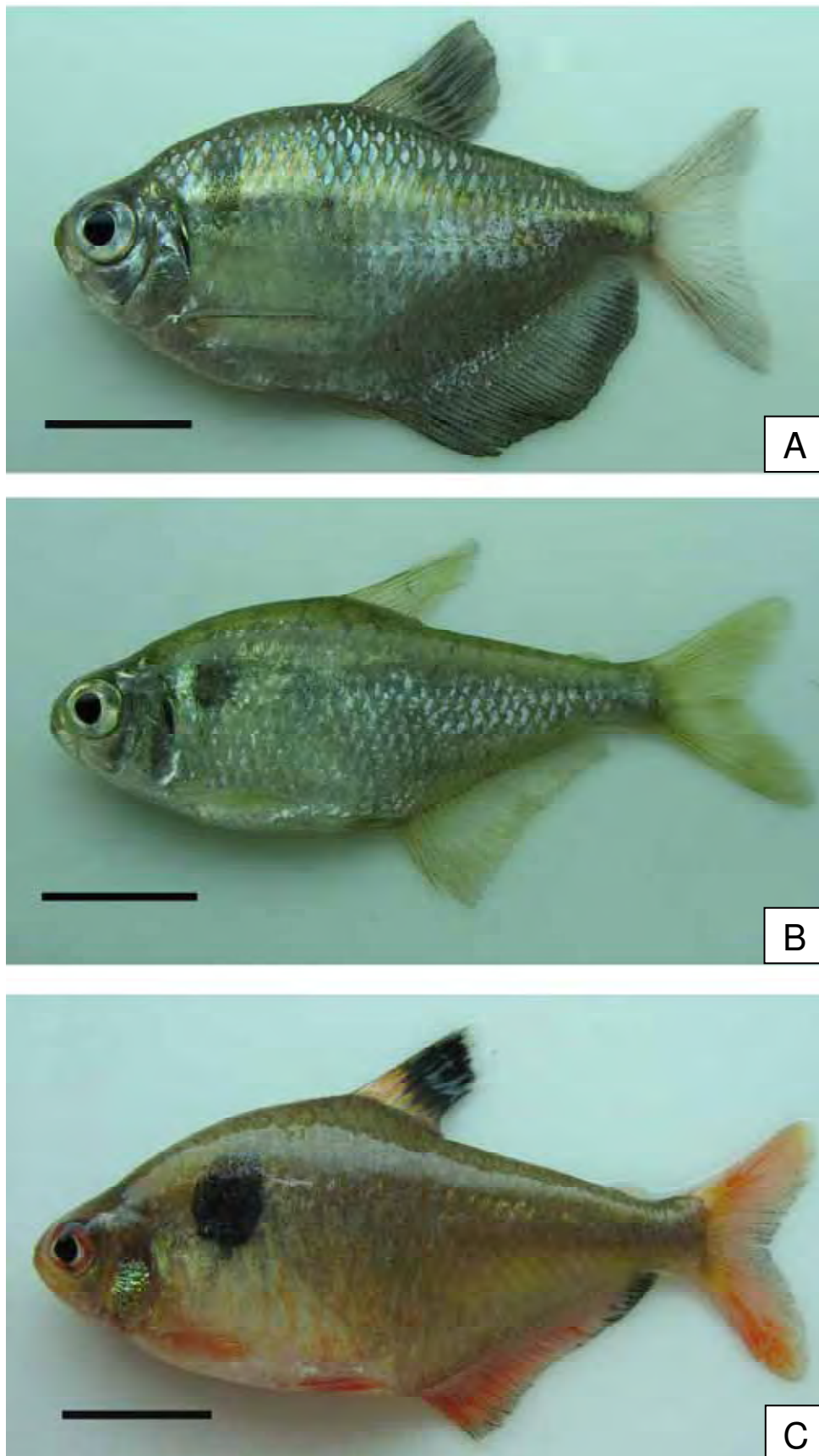


Figura 1. Exemplos adultos de Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi* (A), Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* (B) e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques* (C). Barras = 1 cm

b) Microscopia eletrônica de transmissão

Os estudos de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados com fragmentos de testículo fixados em solução de Karnovsky modificada, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) e contrastados em blocos com solução aquosa de acetato de uranila 0,5%. Após desidratação em seqüência crescente de soluções de acetona, o material foi incluído em araldite e cortado em secções de 0,5 μm , que foram corados com Azul de Toluidina 1% para escolha dos campos. Secções de 50 – 70 nm coletados em telas de cobre sem filme suporte foram contrastados em acetato de uranila. Após lavagem em álcool 50%, o material sofre uma nova contrastação em citrato de chumbo por 20 minutos (Reynolds, 1963). A análise e a fotodocumentação foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM – 100, com utilização de filmes preto e branco 35 mm Eastman 5302 (Kodak), junto ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu – UNESP.

5- Morfometria

Após a captura das imagens com auxílio de um equipamento constituído de microscópio Olympus modelo BX50 (Tokyo, Japan) adaptado a um sistema computadorizado de captura de imagens, os estudos morfométricos foram realizados utilizando-se o programa computacional de imagens Image Pro Plus[®] Version 4.1 (Media Cybernetics – USA), junto ao Laboratório de Anatomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal - UNESP.

Análise do diâmetro (maior e menor) e da área dos núcleos das células germinativas foram estudados em três amostras de cada espécie. Trinta núcleos de cada tipo celular (espermatogônias primárias e secundárias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes e espermatozóides), aleatoriamente selecionados foram analisados (N=90 para cada tipo celular por espécie), utilizando-se objetivas de 20X para as espermatogônias e espermatócitos, e de 40X para as espermatídes e espermatozóides.

6. Análise estatística

Para análise de variância (ANOVA) foi utilizado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Depois de verificadas as pressuposições para a Análise de Variância (Homogeneidade das variâncias – Levene e normalidade dos erros – Cramer-von Mises), as médias dos diâmetros e área dos núcleos dos diferentes tipos celulares encontrados nos testículos das três espécies foram comparadas por teste de Tukey ($p < 0,05$), quando encontradas diferenças. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS 9.0 para Windows.

RESULTADOS

MORFOLOGIA GERAL DOS TESTÍCULOS

1- Características anatômicas dos testículos

Os testículos de Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*, Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques* se apresentam como órgãos pares, alongados, localizados dorsalmente à cavidade celomática, unidos à bexiga natatória na região cranial e aos rins na região caudal, a coloração dos testículos nas três espécies apresenta-se branco leitoso quando maduros (Figs. 2, 8, 9, 12 e 13).

Os testículos de Tetra Negro, *G. ternetzi* apresentaram-se no período de estudo maduros com comprimento médio de 9,59 mm e largura média de 1,30 mm; os testículos de Tetra Amarelo, *H. bifasciatus* apresentaram-se um pouco mais compridos (11,6 mm) e menos largos (1,28 mm) que os testículos de *G. ternetzi*; enquanto os testículos de Mato Grosso, *H. eques*, apresentaram comprimento médio de 11,9 mm e largura média de 0,95 mm.

Na fase de maturação testicular, observou-se que os testículos de *G. ternetzi* apresentaram-se volumosos e principalmente tortuosos (Fig. 3), com superfície irregular, devido às saliências provocadas pelo aumento dos cistos germinativos (Figs. 5, 6 e 7).

Em *H. eques* e *H. bifasciatus* observou-se que a superfície testicular apresentou-se irregular com vasos sanguíneos superficiais aparentes nos testículos pouco desenvolvidos, mas cheia de pequenos sulcos e reentrâncias, quando eles estão em maturação e maduros (Figs. 11 e 15).

Nas três espécies, os testículos estão individualizados na maior parte de sua extensão unindo-se apenas na extremidade caudal (Figs. 4, 10 e 14), para formar o ducto espermático comum, que conflui à papila urogenital. Em *G. ternetzi*, este ducto apresentou comprimento médio de 3,68 mm e largura média de 0,63 mm, em *H. bifasciatus* o comprimento médio é de 3,38 mm e largura média de 0,80 mm, e em

H. eques o ducto apresenta comprimento médio de 2,66 mm e largura média de 0,39 mm.

2- Características histológicas dos testículos

Os testículos das três espécies estudadas encontram-se revestidos por uma túnica conjuntiva, denominada de túnica albugínea que envia septos para o interior do parênquima testicular, separando e sustentando os túbulos seminíferos. Estes são numerosos e dispõem-se lado a lado, de maneira bastante uniforme, embora sofram anastomoses, quando o testículo está maduro (Figs. 27 e 35).

Internamente, os testículos encontram-se divididos em dois compartimentos distintos, o seminífero e o intersticial (Figs. 16, 28, 29 e 38). O compartimento seminífero é constituído por cistos germinativos formados por células da linhagem espermatogênica (espermatogônias primárias e secundárias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes e espermatozóides) em diferentes fases de desenvolvimento, envolvidas por projeções citoplasmáticas das células de Sertoli. Dentro de um mesmo cisto, todas as células germinativas estão na mesma fase do processo de espermatogênese, no entanto, foram observados cistos contendo espermatócitos em diferentes fases de divisão, dentro do mesmo cisto (Figs. 24, 25, 34, 41 e 43).

Espermatogônias primárias são encontradas ao longo da parede dos túbulos seminíferos, caracterizando os testículos de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, como testículos espermatogoniais irrestritos (Figs. 17 e 46).

O compartimento intersticial, nas três espécies encontra-se constituído por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células intersticiais. Este apresentou-se um pouco mais espesso no período de maturação e mais delgado nos testículos maduros (Figs. 16, 17, 27, 28, 29, 35, 37, 38 e 46).

3- Tipos de células germinativas

Nos testículos de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, foram identificados cinco tipos de células germinativas, de acordo com as fases do processo espermatogênico: espermatogônia primária, espermatogônia secundária, espermatócito primário, espermatócito secundário, espermatíde e espermatozóide.

3.1. Espermatogônias primárias: São as maiores células germinativas encontradas nestas espécies. Apresentam citoplasma eosinófilo, claro e abundante, cujo limite pode ser observado com dificuldade. Dentro do citoplasma existem grânulos finos e muito pouco corados, difíceis de visualizar. O núcleo, grande e esférico, localiza-se na região central do citoplasma. Dentro do núcleo há um só nucléolo, bastante evidente, localizado em posição excêntrica. A cromatina forma grumos junto à membrana nuclear, de onde emite filamentos radiais em direção ao nucléolo. Entre os filamentos de cromatina existem grandes espaços vazios, conferindo ao núcleo um aspecto hialino. No período do estudo, essas células foram observadas em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, apresentando-se isoladas ou em duplas, na periferia dos túbulos seminíferos (Figs. 18, 19, 30, 31 e 39), sempre associadas às células císticas ou de Sertoli (Figs. 19, 30 e 39).

3.2. Espermatogônias secundárias: Nos testículos de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, observou-se que as espermatogônias secundárias são semelhantes às anteriores, porém menores e com núcleo basófilo um pouco mais corado, ocupando quase todo o volume da célula, e vários nucléolos excêntricos. A cromatina apresenta-se em grânulos distribuídos de maneira uniforme pelo nucleoplasma. Ocorrem dentro de cistos com número variável de células (Figs. 20, 22, 31 e 40).

3.3. Espermatócitos primários: São menores que as espermatogônias secundárias. Apresentam-se aglomerados em cistos limitados pelos prolongamentos das células de Sertoli, citoplasma hialino e escasso, quase totalmente ocupado pelo núcleo, que apresenta cromatina condensada caracterizando a prófase I da Meiose. Encontram-se espermatócitos primários em diferentes fases de divisão celular, dentro de um mesmo cisto (Figs. 24, 25, 34, 41, e 43). Dependendo do estágio da

prófase I, o núcleo destas células é identificado em leptóteno ou paquíteno. Quando em leptóteno, a cromatina está associada ao envoltório nuclear assumindo um aspecto de “bouquet”; já em paquíteno, os cromossomos estão mais evidenciados e de aspecto filamentosos, devido ao processo de condensação e espiralização mais adiantada da cromatina (Figs. 24, 25 e 34).

3.4. Espermatócitos secundários: Células resultantes da divisão meiótica dos espermatócitos primários, apresentando tamanho menor que os mesmos. Como este período se processa muito rapidamente, dificilmente observam-se cistos com espermatócitos secundários; o que foi visualizado com maior facilidade são cistos contendo espermatócitos primários, no estágio de metáfase para produzir espermatócitos secundários (Figs. 25, 27, 36 e 43).

3.5. Espermátides: O tamanho das espermátides é menor do que os espermatócitos secundários, nas três espécies estudadas. Apresentam núcleo esférico e cromatina em diferentes graus de condensação. Aparecem em grande número dentro dos cistos (Figs. 21, 26 e 44), as quais vão se diferenciar em espermatozóides durante o processo de espermiogênese.

3.6. Espermatozóides: Foram as menores células da linhagem germinativa, encontrados muito agrupados dentro dos cistos. Ocupam a região mais central dos túbulos e aparecem livres na luz tubular. Apresentam ainda, cromatina mais condensada que as espermátides e em algumas ocasiões o flagelo pode ser observado (Figs. 16, 26, 27, 35, 38, 43 e 46).

4- Características ultraestruturais da espermatogênese

G. ternetzi, *H. bifasciatus* e *H. eques*, apresentam espermatogônias primárias circundadas por expansões citoplasmáticas das células de Sertoli, com núcleo volumoso, de formato redondo a ovalado, contorno irregular, cromatina granular pouco condensada e distribuída de forma homogênea. O nucléolo é esférico, ligeiramente excêntrico, bastante desenvolvido, e eletrondenso, apresentando também contorno irregular. O citoplasma tem baixa densidade e pode-se observar várias mitocôndrias arredondadas e alongadas; a matriz é pouco eletrondensa e

com algumas cristas nas proximidades do envoltório nuclear. Entre os grupos de mitocôndrias foram observadas estruturas eletrondensas, conhecidas como cimento intermitocondrial ou algumas vezes dispostos bem próximo aos poros da membrana nuclear, correspondendo as nuages. O retículo endoplasmático não-granuloso está presente, mas parece ser pouco desenvolvido (Fig. 23).

A estrutura das espermatogônias secundárias é similar em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*. Apresentam-se em cistos com duas ou mais células, interligadas por pontes citoplasmáticas, resultantes de citocineses incompletas. Possuem núcleo central, de formato redondo, com cromatina pouco condensada formando pequenos grumos, que dão ao núcleo aspecto heterogêneo. A periferia do núcleo apresenta-se ligeiramente mais escura que o centro dele. Dentro do núcleo observa-se de um a três nucléolos, bastante eletrondensos e com contorno irregular, localizados em posição excêntrica. Quando em número de três, estes nucléolos se dispõem de modo a formar um triângulo imaginário. As mitocôndrias são menos volumosas e densas, comparadas com as encontradas nas espermatogônias primárias, e podem encontrar-se dispersas pelo citoplasma ou concentradas num dos pólos da célula, entre as quais observam-se algumas nuages chamadas de cimento intermitocondrial, associadas a mitocôndrias. As nuages também são menos numerosas que nas espermatogônias primárias e encontram-se um pouco mais afastadas da membrana nuclear. O retículo endoplasmático não-granuloso pode ser observado no citoplasma (Figs. 33 e 42).

Os espermatócitos primários apresentaram características similares, nas três espécies estudadas. Encontram-se associados uns aos outros por meio de pontes citoplasmáticas. O núcleo dos espermatócitos primários apresenta-se volumoso, arredondado, com contorno irregular e deslocado para um dos pólos da célula. A cromatina é irregularmente condensada, com aspecto bastante heterogêneo. O citoplasma, agora concentrado num dos pólos da célula, apresenta poucas mitocôndrias arredondadas e alongadas, os complexos de Golgi estão localizados próximos as pontes citoplasmáticas. O retículo endoplasmático não-granuloso apresenta-se bem desenvolvido (Fig. 45).

Dentro de um mesmo cisto encontram-se espermatócitos primários em diferentes fases da prófase I, caracterizando a espermatogênese como assincrônica. Durante o estágio de paquíteno, são encontrados os complexos sinaptonêmicos que são constituídos por duas faixas eletrondensas paralelas, estreitas e alongadas, chamadas elementos laterais, ligadas a uma faixa central, também estreita e alongada, porém menos eletrondensa, chamada elemento medial (Fig. 45). Estes são formados a partir das regiões teloméricas dos cromossomos ligados ao envoltório nuclear, e avançam para a região central do núcleo.

Ao término da primeira divisão meiótica, ocorre a formação dos espermatócitos secundários, nesta fase os cistos apresentam as células em desenvolvimento ligeiramente assincrônico. Os espermatócitos secundários são células de difícil visualização, devido à curta duração deste estágio celular. Desta forma, durante a análise histológica é comum encontrarmos cistos germinativos apresentando espermatócitos primários em divisão, juntamente com alguns espermatócitos secundários presentes (Figs. 34 e 43).

5- Características ultraestruturais da espermiogênese

Ao término da segunda divisão meiótica, observa-se o aparecimento das espermátides jovens, caracterizando o início do processo de espermiogênese. Este processo envolve a diferenciação das espermátides redondas recém formadas, em espermatozóides, com alterações nucleares e citoplasmáticas.

A análise ultraestrutural do processo de espermiogênese foi muito similar em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*. A espermiogênese nas três espécies estudadas ocorreu dentro de espermatocistos ou cistos que estão localizados no epitélio germinal. Os cistos são formados por prolongamentos citoplasmáticos de uma ou mais células de Sertoli, que envolvem as células germinativas, unidas por pontes citoplasmáticas resultantes de citocineses incompletas das divisões mitóticas e meióticas (Fig. 33).

Durante a espermiogênese, a cromatina sofre um processo progressivo de condensação tornando-se altamente compactada, resultando na redução do

tamanho do núcleo nas espermatídes maduras e conseqüentemente nos espermatozóides.

No início da espermiogênese, nas três espécies objeto de estudo, observou-se que as espermatídes apresentam o complexo centriolar situado lateralmente ao núcleo, com o centríolo distal ancorado à membrana plasmática, que se diferencia em corpúsculo basal e dá origem ao axonema do flagelo. Concomitantemente ocorre o movimento do complexo centriolar em direção ao núcleo, arrastando consigo a membrana plasmática e formando deste modo, o canal citoplasmático, espaço entre o flagelo e a membrana plasmática (Figs. 51, 53, 54, 58, 59, 60, 64, 67, 69 e 71).

Nas espermatídes iniciais, a cromatina encontra-se difusa, com aspecto homogêneo, entretanto, com o decorrer do processo a compactação da cromatina ocorre na forma de filamentos justapostos, com áreas elétron-lúcidas (Figs. 55, 60, 65, 66 e 69).

Nas três espécies estudadas, foi observada rotação nuclear das espermatídes. O complexo centriolar se encontra medial ao núcleo, conseqüentemente as espermatídes finais e os espermatozóides apresentam flagelo perpendicular ao núcleo (Figs. 51, 52, 60 e 70). Ao realizar a rotação nuclear ocorre a formação de uma depressão na base do núcleo, denominada fossa nuclear (Figs. 59 e 60). Entretanto, nem sempre a formação desta estrutura está vinculada ao evento da rotação. Os centríolos proximal e distal são perpendiculares um ao outro e se localizam na fossa nuclear, que tem forma de U invertido (Figs. 49, 50 e 55). Em *H. eques* e em *H. bifasciatus*, a fossa nuclear se apresenta em forma de arco duplo, alojando cada um dos centríolos (Figs. 58 e 68). O centríolo distal origina o flagelo, cujo eixo geralmente é perpendicular ao núcleo, mas pode apresentar pequenas variações no ângulo de inserção com o mesmo (Figs. 50 e 58). No citoplasma as mitocôndrias tornam-se mais elétron-densas, o complexo de Golgi e grande quantidade de vesículas em formação concentram-se próximos à base do núcleo.

A seguir, a massa citoplasmática agora mais elétron-densa, desloca-se no sentido do flagelo levando a uma diminuição do mesmo em torno do núcleo e à formação da peça intermediária do futuro espermatozóide (Figs. 48, 53, 59 e 70). O

excesso de citoplasma de cada espermátide é eliminado na forma de corpos residuais, na luz dos cistos.

6- Características dos espermatozóides

Os espermatozóides de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* são as menores células da linhagem germinativa; possuem cabeça esférica, peça intermediária ligeiramente assimétrica, flagelo perpendicular e medial a base do núcleo e ausência de acrossoma (Figs. 47, 48, 54, 56, 57, 62, 63 e 64). Na cabeça, a membrana nuclear apresenta um contorno irregular e o núcleo é circundado por uma estreita faixa citoplasmática. A cromatina apresenta-se homoganeamente compactada na forma de filamentos justapostos, sendo entremeada por áreas elétron-lúcidas (Figs. 52, 55, 60 e 69). A peça intermediária é longa apresentando mitocôndrias de forma arredondada na sua parte anterior (Figs. 52, 53, 55, 58, 59, 60 e 71). Essas organelas estão separadas do segmento inicial do flagelo por um canal citoplasmático (Figs. 52, 53, 58, 59, 60, 69, e 71). O flagelo é envolvido em toda a sua extensão pela membrana flagelar, possui eixo perpendicular e ligeiramente excêntrico à base do núcleo, e apresenta axonema básico 9+2 (9 duplas de microtúbulos periféricos e uma dupla central) (Figs. 61 e 67). Diferenciações intratubulares e nadadeiras axonemais não foram observadas.

7- Características das células de Sertoli

Quanto às características ultraestruturais das células de Sertoli, nas três espécies de peixes estudadas, observou-se que estas formam a parede do cisto germinativo, envolvendo com seus prolongamentos citoplasmáticos as células da linhagem germinativa, geralmente numa mesma fase de desenvolvimento (Fig. 42). O núcleo apresenta forma irregular, podendo ser alongado ou triangular (Figs. 32 e 42). A cromatina forma finos grânulos distribuídos por todo o núcleo, com regiões mais elétron-densas, junto à membrana nuclear (Fig. 42). O nucléolo é pequeno e bastante elétron-denso, localizando-se numa das extremidades do núcleo (Fig. 32). O citoplasma apresenta densidade eletrônica baixa, com mitocôndrias redondas ou alongadas e retículo endoplasmático rugoso abundante (Fig. 32). Foram observadas

junções de tipo “tight” e por desmossomos entre duas células de Sertoli e entre células de Sertoli e células germinativas (Figs. 32 e 42).

8- Morfometria

Os valores médios de área (μm^2) e diâmetro médio (μm) dos núcleos das células germinativas observadas em testículos de Tetra Negro, *G. ternetzi*; Tetra Amarelo, *H. bifasciatus* e Mato Grosso, *H. eques*, são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Área (μm^2) e diâmetro médio (μm) das células germinativas em testículos de Tetra Negro, *G. ternetzi*; Tetra Amarelo, *H. bifasciatus* e Mato Grosso, *H. eques*.

Tipo Celular / Variável		Tetra Negro	Tetra Amarelo	Mato Grosso
Espermatogônia Prim.	Área	56,40 ± 10,20a	49,99 ± 7,84b	42,55 ± 6,47c
	Diâmetro	8,25 ± 0,78a	7,73 ± 0,66b	7,09 ± 0,57c
Espermatogônia Sec.	Área	34,26 ± 7,05a	32,19 ± 6,0b	33,11 ± 4,88ab
	Diâmetro	6,31 ± 0,66a	6,12 ± 0,58b	6,22 ± 0,47ab
Espermatócito Prim.	Área	28,35 ± 2,78a	25,42 ± 2,24b	24,59 ± 3,32c
	Diâmetro	5,75 ± 0,29a	5,45 ± 0,25b	5,34 ± 0,37c
Espermátide	Área	7,83 ± 1,32a	7,89 ± 1,01a	6,81 ± 0,84b
	Diâmetro	2,90 ± 0,28a	2,92 ± 0,22a	2,70 ± 0,17b
Espermatozóide	Área	4,77 ± 0,57a	4,96 ± 0,80a	3,98 ± 0,43b
	Diâmetro	2,24 ± 0,18a	2,28 ± 0,21a	2,02 ± 0,14b

Valores médios (\pm DP; n = 90); Médias seguidas da mesma letra na horizontal não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

As espermatogônias primárias são as maiores células da linhagem germinativa nas três espécies objeto de estudo, no entanto, diferenças na área e no diâmetro médio dos núcleos foram observadas quando comparadas entre as três espécies. Evidenciou-se que *G. ternetzi* apresenta os maiores valores de área e diâmetro nucleares e difere estatisticamente das outras duas espécies ($p < 0,05$), enquanto que *H. eques* apresenta os menores valores e difere estatisticamente das outras duas espécies ($p < 0,05$).

As espermatogônias secundárias apresentam área e diâmetro de maior tamanho em *G. ternetzi* que difere estatisticamente da área e diâmetro dos núcleos

das espermatogônias secundárias de *H. bifasciatus*, e não difere do diâmetro e área dos núcleos das espermatogônias secundárias de *H. eques*.

Os núcleos dos espermátocitos primários de *G. ternetzi* apresentaram o maior diâmetro médio, e área das três espécies estudadas diferindo estatisticamente das outras duas espécies; *H. eques* apresenta a menor área e diâmetro dos núcleos dos espermátocitos primários e difere estatisticamente das outras duas espécies objeto de estudo.

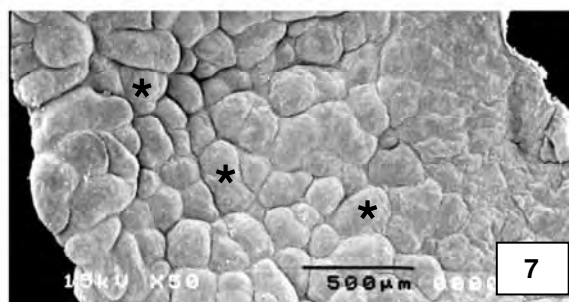
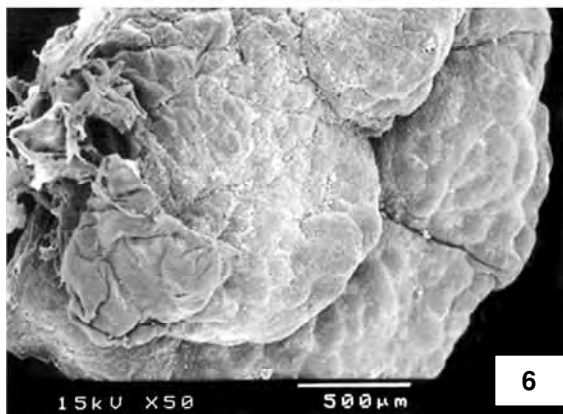
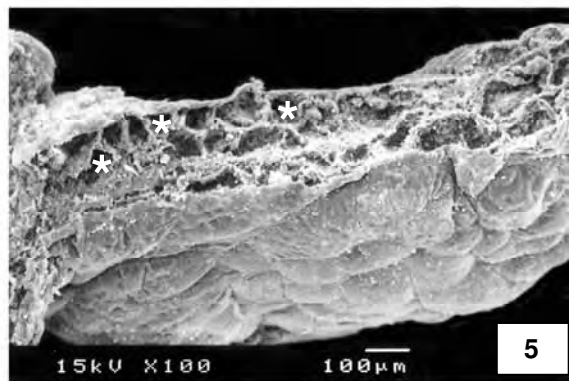
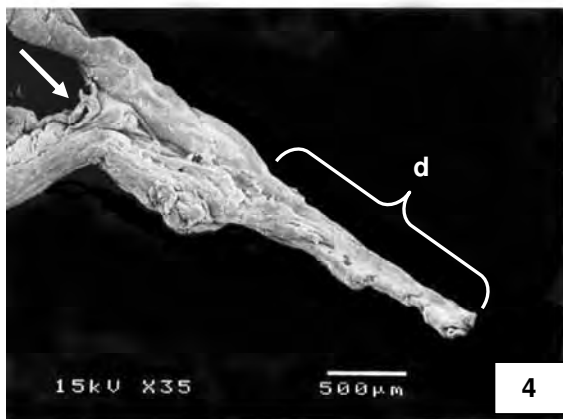
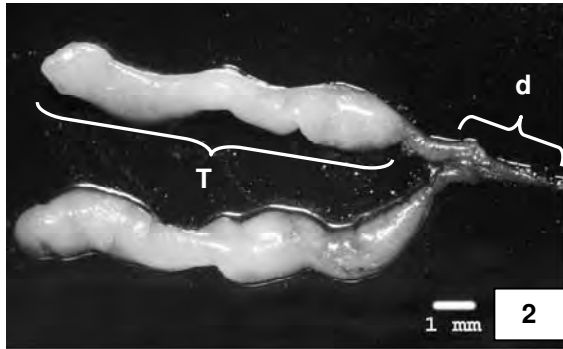
Os núcleos das espermátides de *G. ternetzi* e *H. bifasciatus* apresentam os maiores valores de diâmetro e área, não diferindo estatisticamente entre si. Os núcleos das espermátides em *H. eques* apresentam os menores valores para diâmetro médio e área, que difere estatisticamente das outras duas espécies estudadas.

Os valores do diâmetro médio e da área dos núcleos dos espermatozóides de *G. ternetzi* e *H. bifasciatus* são maiores não diferindo estatisticamente entre si. Os núcleos dos espermatozóides em *H. eques* apresentam os menores valores para diâmetro médio e área, que difere estatisticamente das outras duas espécies estudadas.

A peça intermediária em *G. ternetzi* apresenta tamanho médio de 0,91 μm ; em *H. bifasciatus* 0,95 μm e em *H. eques* 0,77 μm , finalmente, o flagelo em *G. ternetzi* apresenta comprimento médio de 12,69 μm , em *H. bifasciatus* 11,68 μm e em *Hyphessobrycon eques* 10,91 μm (Fig. 72).

Morfologia testicular de Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*.

- Fig. 2. Testículos em fase inicial de maturação indicando o testículo (t) e o ducto espermático comum (d).
- Fig. 3. Testículos volumosos e tortuosos, destacando a presença de reentrâncias (seta).
- Fig. 4. Elétron micrografia de varredura dos testículos indicando a união testicular na extremidade caudal (seta), e detalhe do ducto espermático comum (d).
- Fig. 5. Elétron micrografia de varredura da vista interna do testículo destacando os espermatocistos (asteriscos).
- Fig. 6. Detalhe da superfície testicular.
- Fig. 7. Elétron micrografia de varredura da superfície testicular, apresentando relevo irregular, formado pelo aumento dos cistos germinativos (asteriscos).



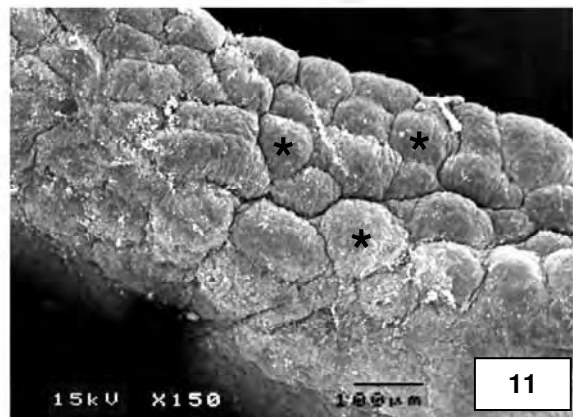
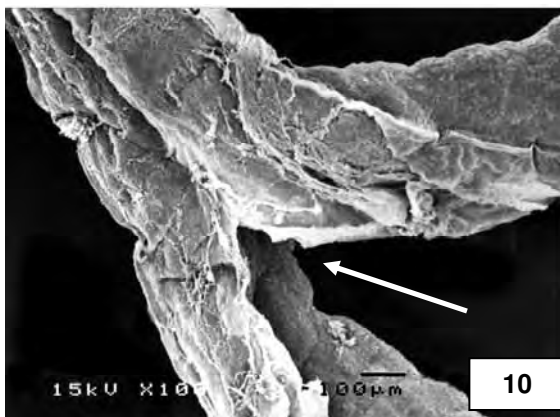
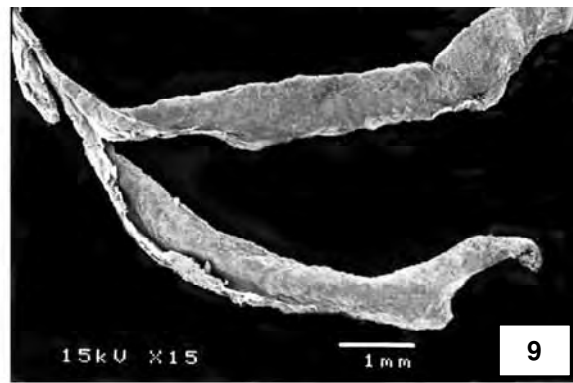
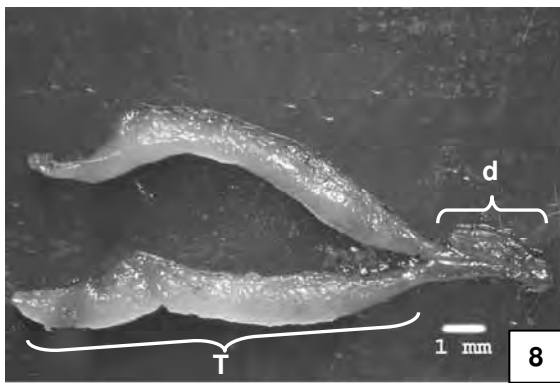
Morfologia testicular de Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus*.

Fig. 8. Fotografia dos testículos maduros, com destaque para o testículo (T) e o ducto espermático comum (d).

Fig. 9. Elétron micrografia de varredura dos testículos maduros.

Fig. 10. Elétron micrografia de varredura dos testículos indicando a união testicular na extremidade caudal (seta).

Fig. 11. Elétron micrografia de varredura da superfície testicular, apresentando relevo irregular, formado pelo aumento dos cistos germinativos (asteriscos).



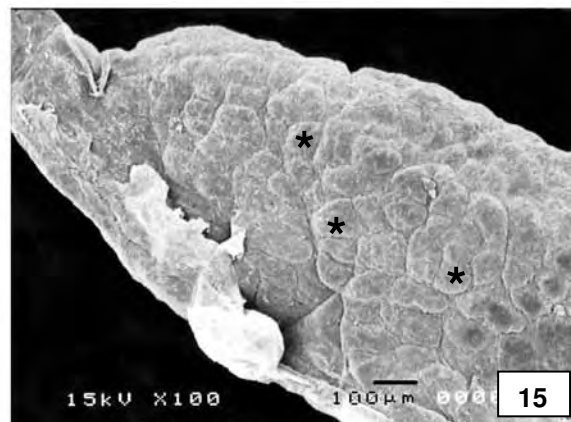
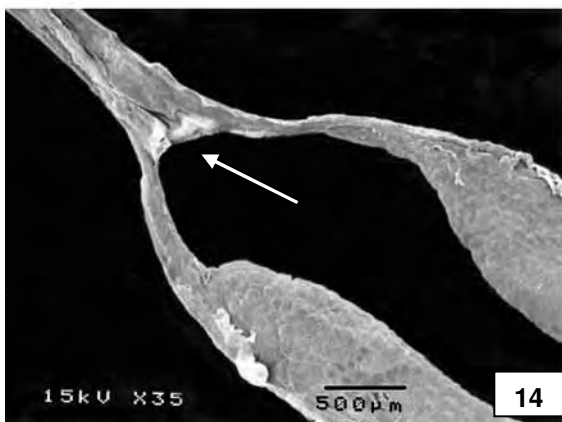
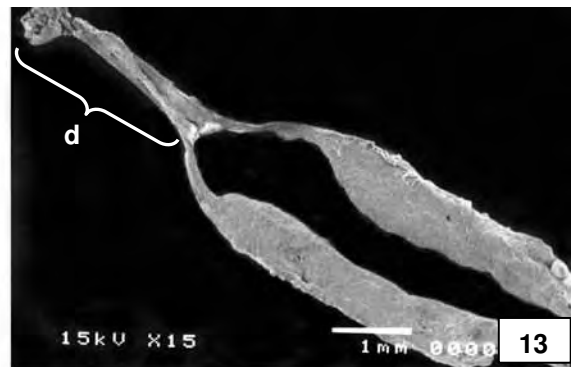
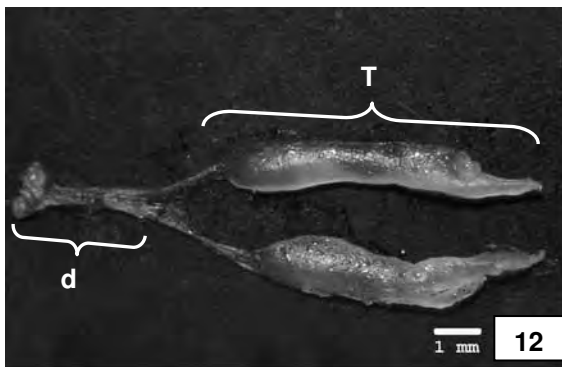
Morfologia testicular de Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques*.

Fig. 12. Testículos maduros com destaque para o testículo (T) e o ducto espermático comum (d).

Fig. 13. Elétron micrografia de varredura dos testículos maduros, detalhe do ducto espermático comum (d).

Fig. 14. Elétron micrografia de varredura dos testículos, indicando a união testicular na extremidade caudal (seta).

Fig. 15. Elétron micrografia de varredura da superfície testicular, apresentando relevo irregular, formado pelo aumento dos cistos germinativos (asteriscos).



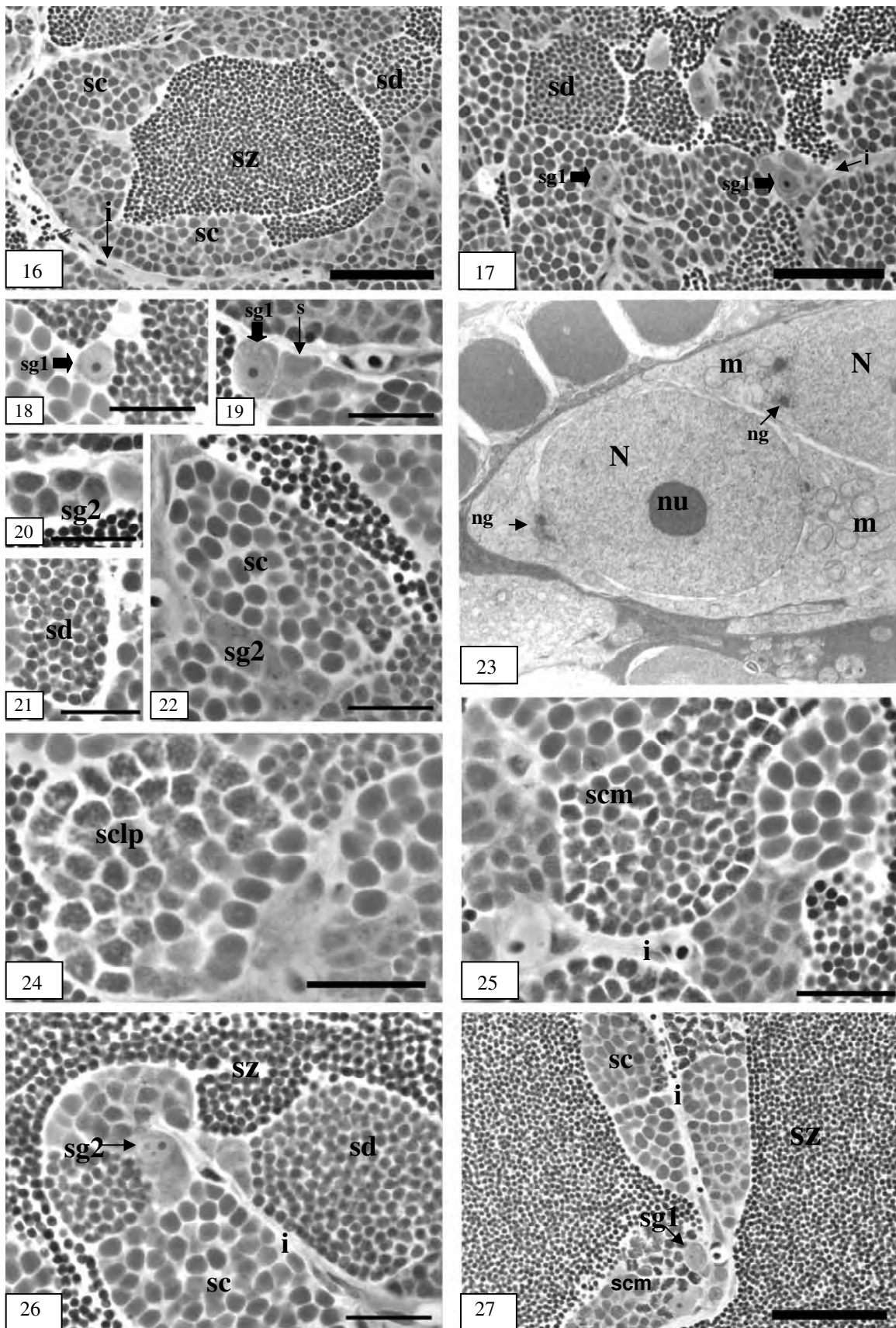
Espermatogênese de Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*.

- Figs. 16 e 17. Túbulos Seminíferos com cistos germinativos em diferentes fases de desenvolvimento.
- Figs. 18 e 19. Espermatogônias primárias.
- Figs. 20 e 22. Cistos de espermatogônias secundárias.
- Fig. 21. Cisto de espermatídes jovens.
- Fig. 23. Ultraestrutura da espermatogônia primária. 13 250 X.
- Figs. 24 e 25. Cistos de espermatócitos primários em diferentes estágios da meiose.
- Figs. 26 e 27. Testículo maduro apresentando grande quantidade de espermatozóides.

Figs. 16, 17 e 27 (Barras = 50 μ m; Azul de Toluidina); **Figs. 18 - 22, 24 - 26** (Barras = 20 μ m; Azul de Toluidina).

ABREVIATURAS

sg1: Espermatogônia primária; **sg2:** Espermatogônia secundária; **i:** Tecido intersticial; **sc:** Espermatócito primário; **sd:** Espermatíde; **sz:** Espermatozóide; **s:** Célula de Sertoli; **sclp:** Espermatócito primário em leptóteno; **scm:** Espermatócito primário em metáfase; **N:** Núcleo; **nu:** Nucléolo; **ng:** Nuages; **m:** Mitocôndria.

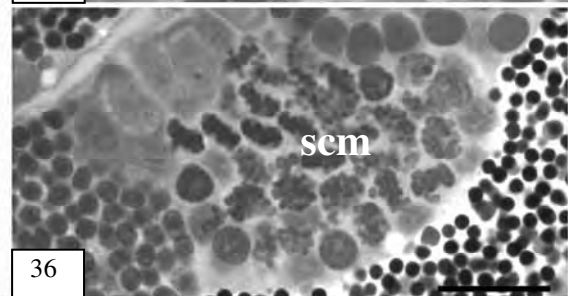
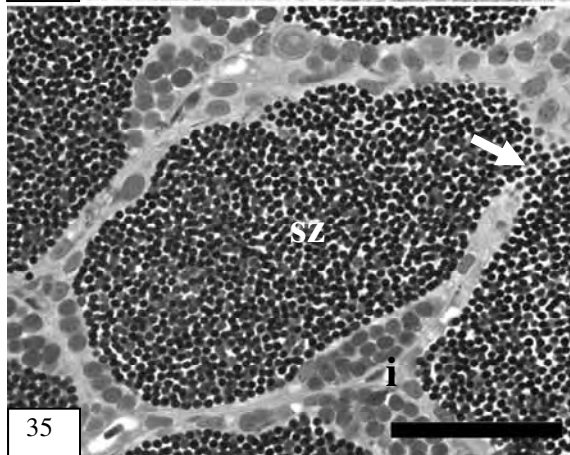
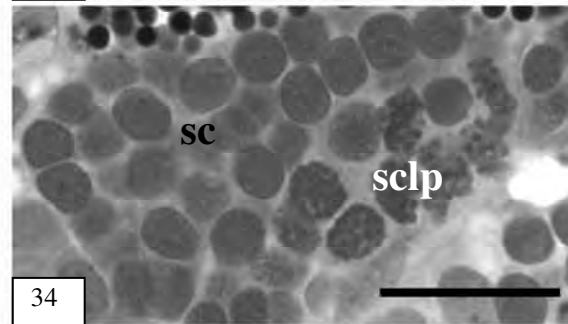
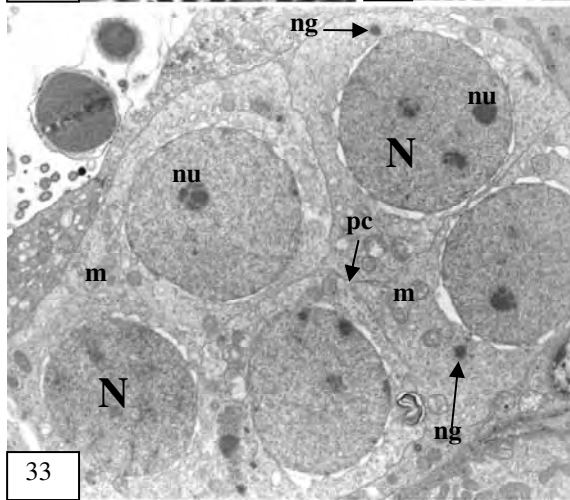
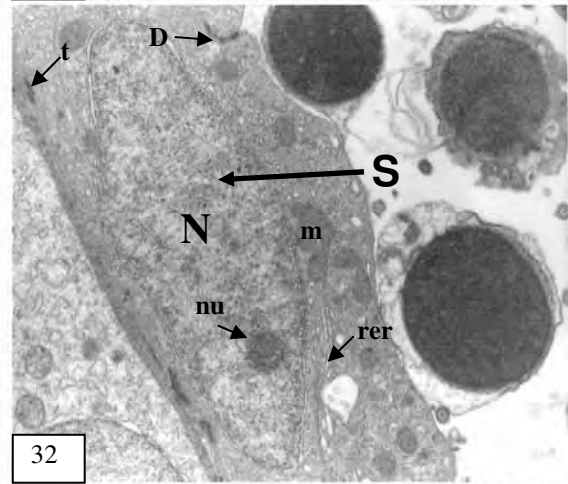
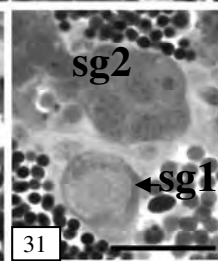
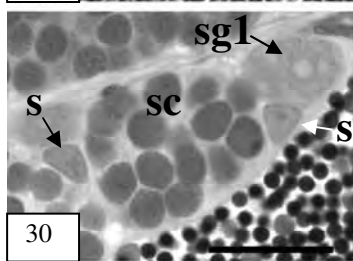
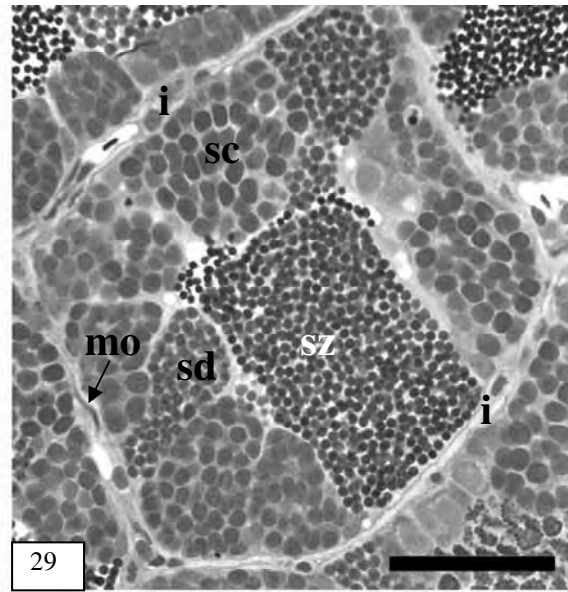
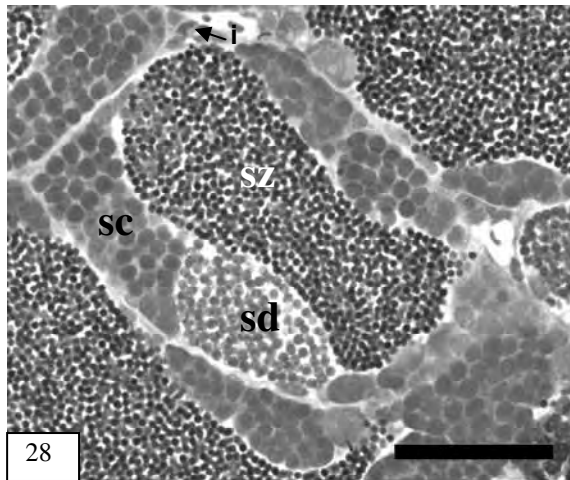


Espermatogênese de Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus*

- Figs. 28 e 29. Túbulos seminíferos com cistos germinativos em diferentes fases de desenvolvimento, diferenciando o compartimento seminífero e o intersticial.
- Fig.30. Espermatogônia primária.
- Fig. 31. Cisto de espermatogônias secundárias.
- Fig. 32. Características ultraestruturais de célula de Sertoli 17 000 X.
- Fig.33. Características ultraestruturais de espermatogônias secundárias 5 750 X.
- Figs. 34 e 36. Cistos de espermatócitos primários em diferentes estágios da meiose.
- Fig. 35. Túbulo apresentando grande quantidade de espermatozóides e anastomose com outro túbulo (Seta branca).
- Figs. 28, 29, 35** (Barras= 50 µm; Azul de Toluidina); **Figs. 30, 31, 34, 36** (Barras= 20 µm; Azul de Toluidina).

ABREVIATURAS

sg1: Espermatogônia primária; **sg2:** Espermatogônia secundária; **i:** Tecido intersticial; **sc:** Espermatócito primário; **sd:** Espermátide; **sz:** Espermatozóide; **s:** Célula de Sertoli; **sc1p:** Espermatócito primário em leptóteno; **scm:** Espermatócito primário em metáfase; **N:** Núcleo; **nu:** Nucléolo; **ng:** Nuages; **m:** Mitocôndria; **mo:** Células mióides; **pc:** Ponte citoplasmática; **rer:** Retículo endoplasmático rugoso; **D:** Desmossomos; **t:** Junções "tight".



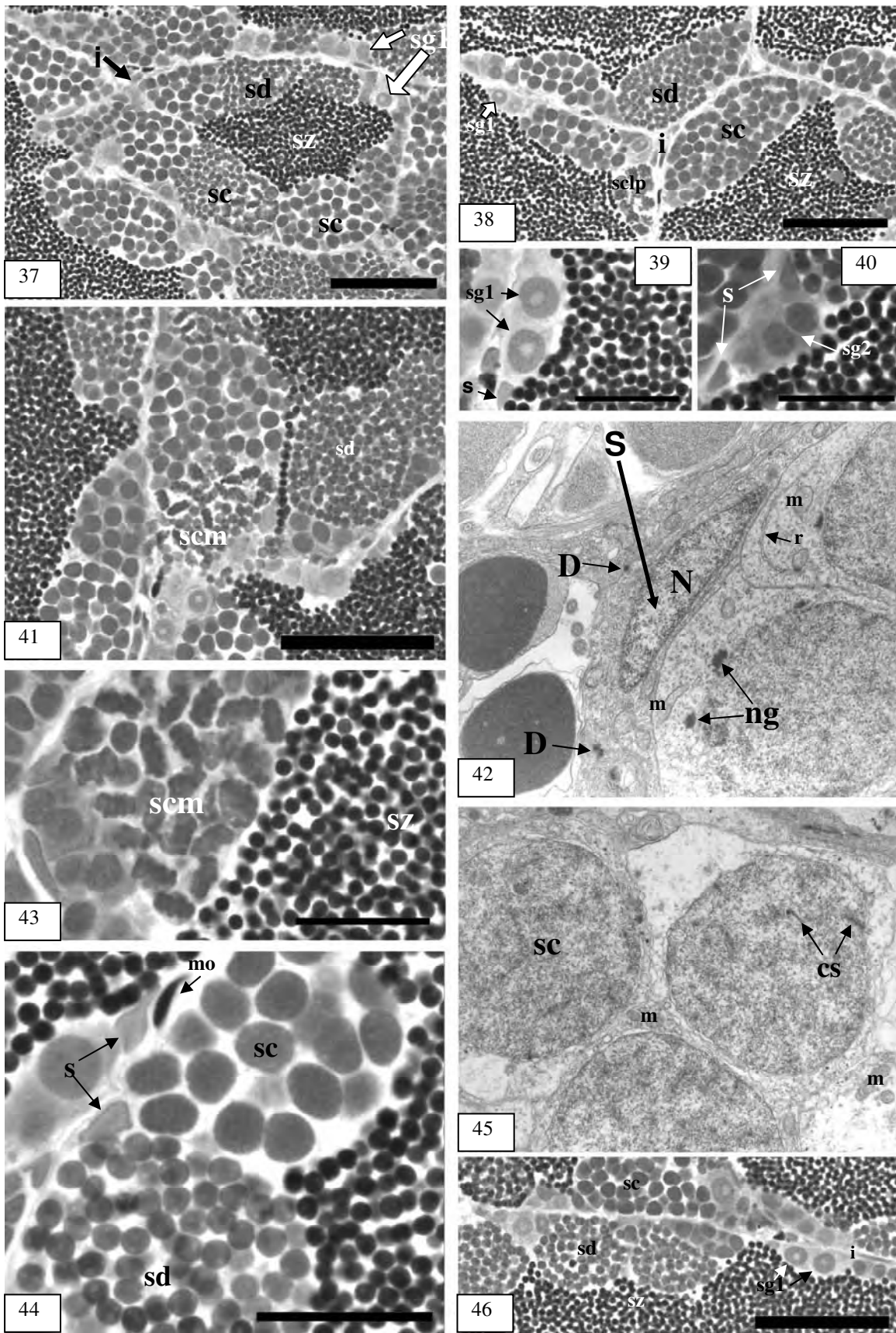
Espermatogênese de Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques*.

- Fig. 37. Túbulos seminíferos com cistos germinativos em diferentes fases de desenvolvimento.
- Fig. 38. Compartimentos seminífero e intersticial.
- Fig. 39. Espermatogônias primárias em dupla.
- Fig. 40. Cisto de espermatogônias secundárias.
- Figs. 41 e 43. Cistos de espermatócitos primários em diferentes estágios da meiose.
- Fig. 42. Elétron micrografia de transmissão mostrando célula de Sertoli com expansões citoplasmáticas envolvendo cisto de espermatogônias secundárias 17 000X.
- Fig. 44. Cisto de espermatídes jovens.
- Fig. 45. Características ultraestruturais de espermatócitos primários 13 250 X.
- Fig. 46. Túbulo seminífero apresentando grande quantidade de espermatozóides, são observadas ainda espermatogônias primárias e secundárias.

Figs. 37, 38, 41, 46 (Barras = 50 µm; Azul de Toluidina); **Figs. 39, 40, 43, 44** (Barras = 20 µm; Azul de Toluidina).

ABREVIATURAS

sg1: Espermatogônia primária; **sg2:** Espermatogônia secundária; **i:** Tecido intersticial; **sc:** Espermatócito primário; **sd:** Espermatíde; **sz:** Espermatozóide; **s:** Célula de Sertoli; **sc1p:** Espermatócito primário em leptóteno; **scm:** Espermatócito primário em metafase; **N:** Núcleo; **ng:** Nuages; **m:** Mitocôndria; **mo:** Células mióides; **r:** Retículo endoplasmático não-granuloso; **cs:** Complexo sinaptonêmico; **D:** Desmossomos.

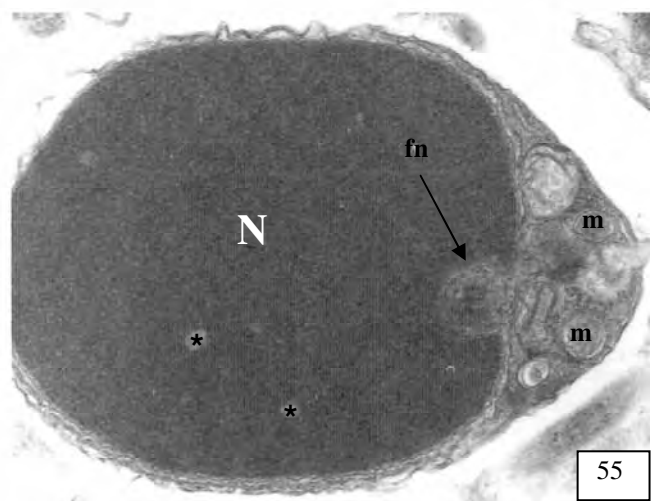
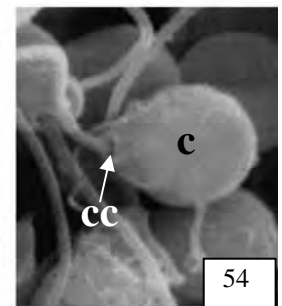
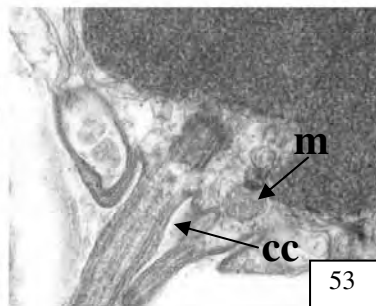
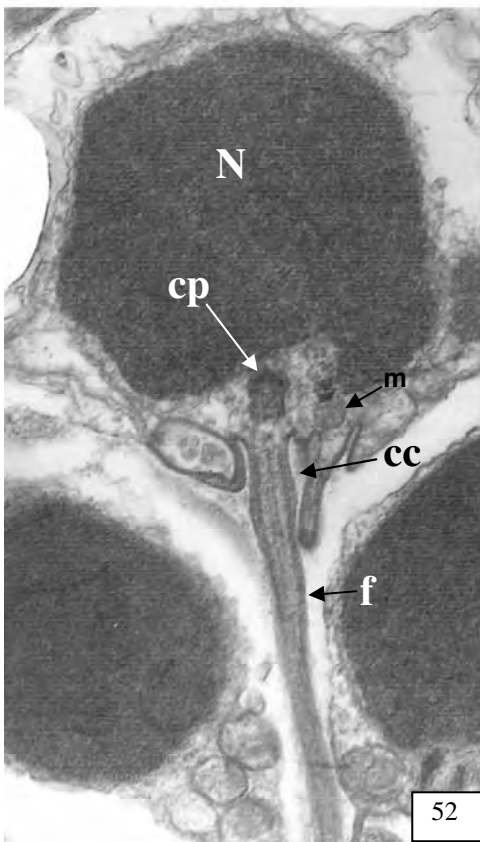
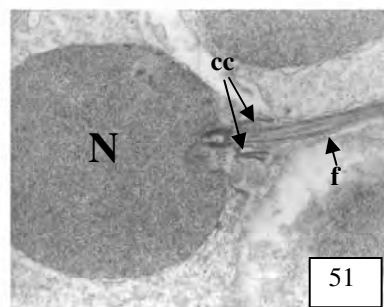
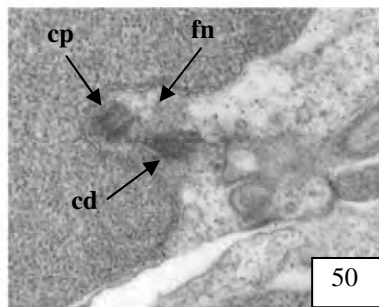
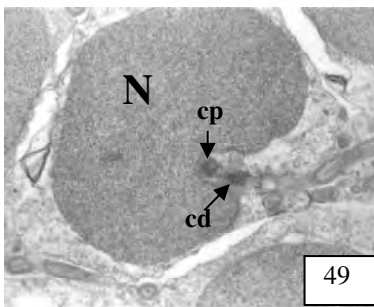
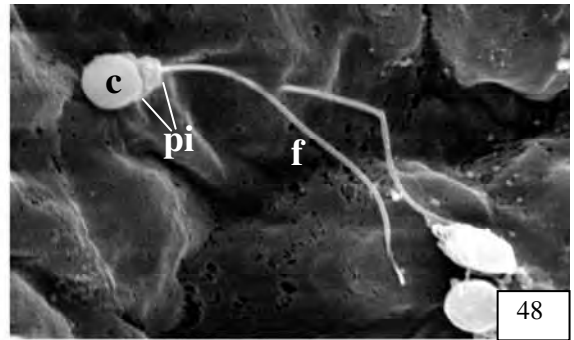
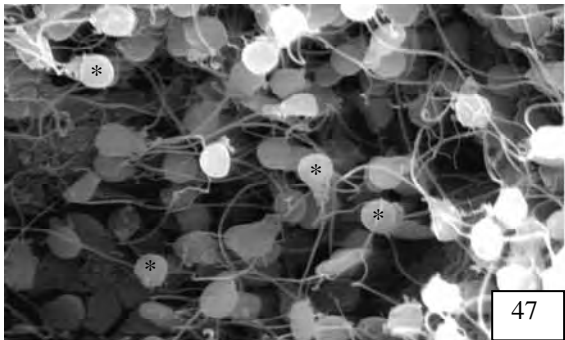


Espermio gênese de Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*

- Fig. 47. Elétron micrografia de varredura de espermatozóides evidenciando as cabeças esféricas (asteriscos), (2 920X).
- Fig. 48. Detalhe do espermatozóide apresentando cabeça esférica, (4925X).
- Fig. 49. Elétron micrografia de transmissão mostrando espermátide jovem com cromatina em fase de compactação, (21100 X).
- Fig. 50. Detalhe da disposição dos centríolos proximal e distal, (45 800X).
- Fig. 51. Espermátide destacando a formação do canal citoplasmático, (22200 X).
- Fig. 52. Espermatozóide maduro, (45 160X).
- Fig. 53. Detalhe da formação do canal citoplasmático, (56 650X).
- Fig. 54. Elétron micrografia de varredura de espermatozóide com destaque do canal citoplasmático, (11 400X).
- Fig. 55. Núcleo de espermatozóide apresentando áreas elétron-lúcidas (asteriscos) (60 500X).

ABREVIATURAS

N: Núcleo; **c:** Cabeça; **m:** Mitocôndria; **pi:** Peça intermediária; **f:** Flagelo; **cp:** Centríolo proximal; **cd:** Centríolo distal; **fn:** Fossa nuclear; **cc:** canal citoplasmático.

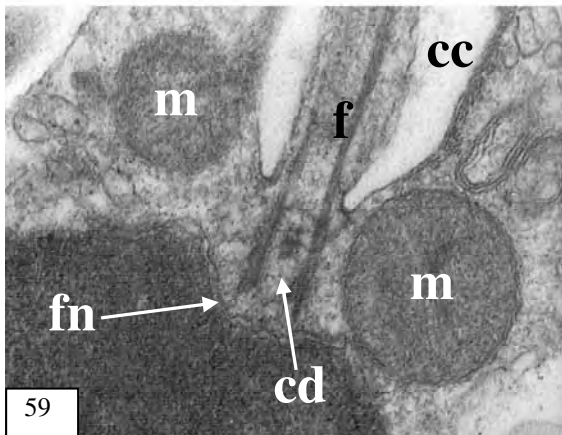
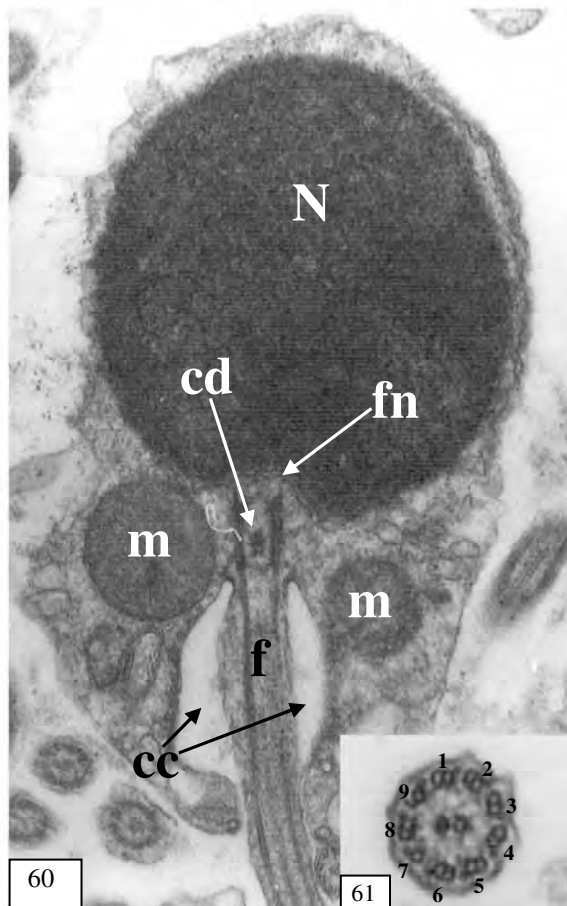
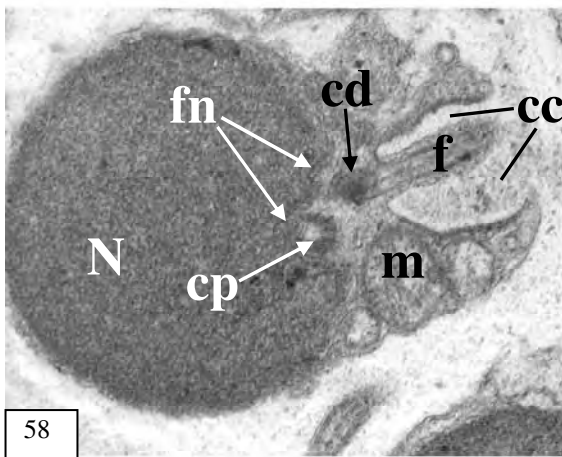
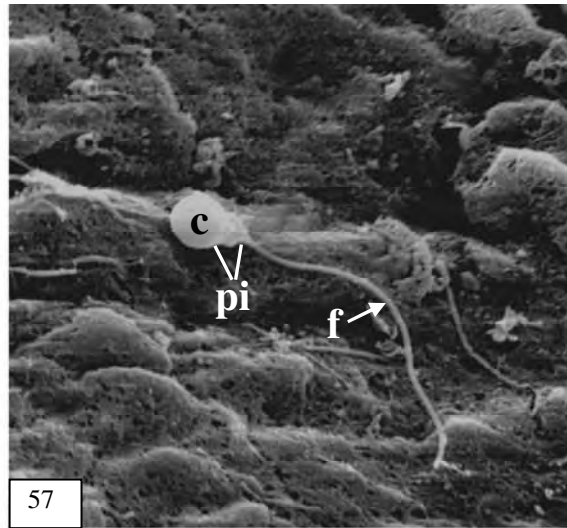
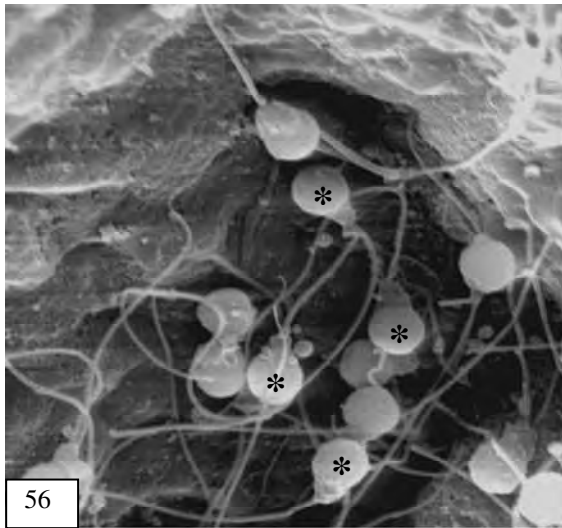


Espermiogênese de Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus*

- Fig. 56. Elétron micrografia de varredura de espermatozóides evidenciando as cabeças esféricas (asteriscos), (5 000X).
- Fig. 57. Detalhe do espermatozóide apresentando cabeça esférica, (5000X).
- Fig. 58. Elétron micrografia de transmissão mostrando espermátide jovem com cromatina em fase de compactação, detalhe da disposição dos centríolos proximal e distal e disposição da fossa nuclear em arco duplo, (19 000X).
- Fig. 59. Detalhe da peça intermediária, (33 400X).
- Fig. 60. Espermatozóide maduro apresentando cromatina com áreas elétronicamente lúcidas, (23 000X).
- Fig. 61. Detalhe do complexo axonemal, 9 duplas de microtúbulos periféricos e uma dupla central, (58 000X).

ABREVIATURAS

N: Núcleo; **c:** Cabeça; **m:** Mitocôndria; **pi:** Peça intermediária; **f:** Flagelo; **cp:** Centríolo proximal; **cd:** Centríolo distal; **fn:** Fossa nuclear; **cc:** canal citoplasmático.

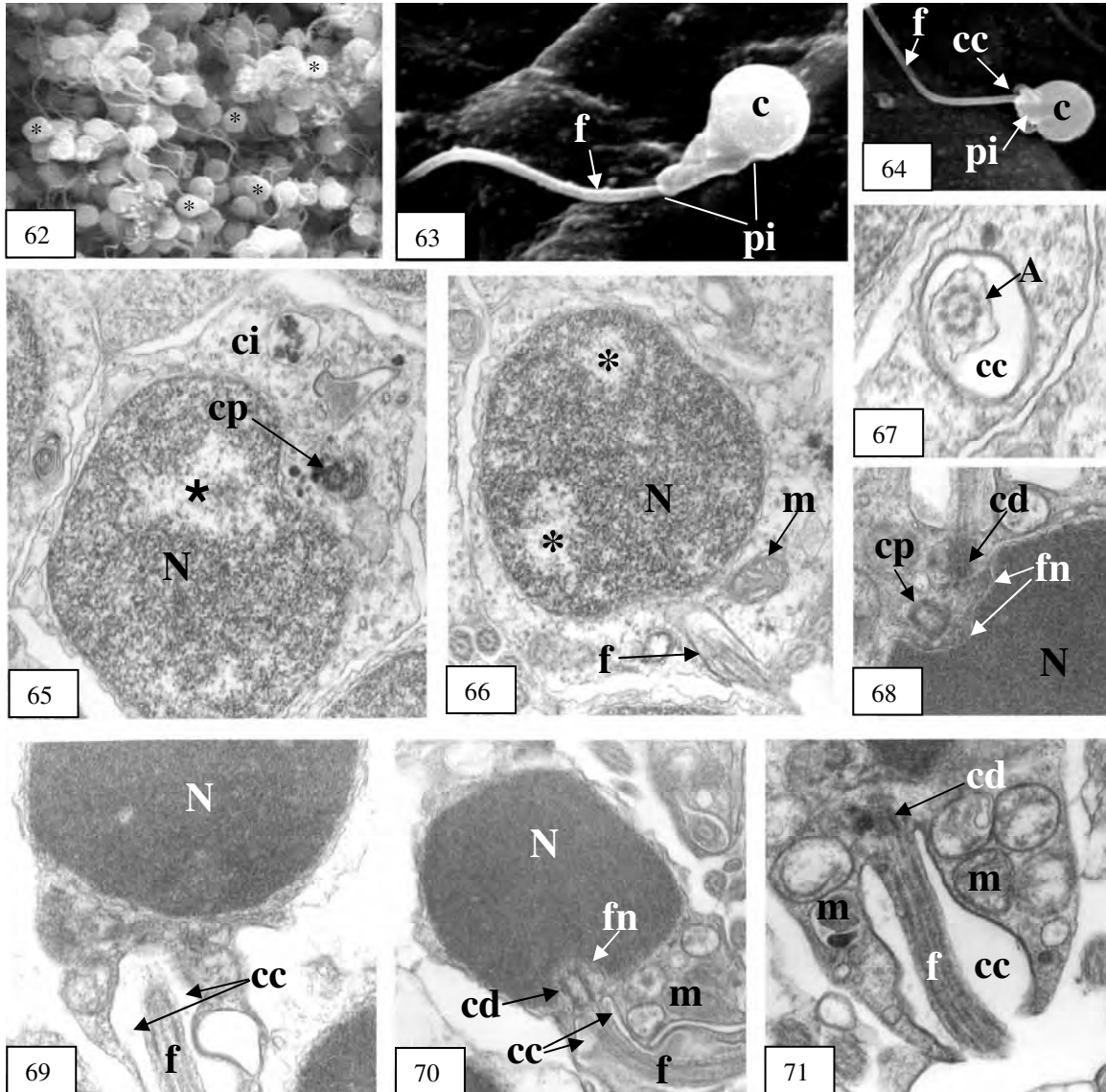


Espermiogênese de Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques*

- Fig. 62. Elétron micrografia de varredura de espermatozóides evidenciando as cabeças esféricas (asteriscos), (2 200X).
- Fig. 63. Detalhe do espermatozóide apresentando cabeça arredondada, (9000X).
- Fig. 64. Elétron micrografia de varredura de espermatozóide com destaque do canal citoplasmático, (6 000X).
- Fig. 65. Elétron micrografia de transmissão mostrando espermátide jovem com cromatina em fase de compactação, destaque para áreas elétron-lúcidas (asterisco), (31 500X).
- Fig. 66. Cromatina em condensação com destaque para áreas elétron-lúcidas (asteriscos), (31 500X).
- Fig. 67. Detalhe do axonema e canal citoplasmático, (74 000X).
- Fig. 68. Detalhe da disposição dos centríolos proximal e distal e disposição da fossa nuclear em arco duplo, (42 000X).
- Fig. 69. Espermatozóide maduro, (42 000X).
- Fig. 70. Fossa nuclear alojando centríolo distal, (42 000X).
- Fig. 71. Detalhe da peça intermediária de um espermatozóide maduro, (49000 X).

ABREVIATURAS

N: Núcleo; **c:** Cabeça; **m:** Mitocôndria; **pi:** Peça intermediária; **f:** Flagelo; **ci:** Citoplasma; **cp:** Centríolo proximal; **cd:** Centríolo distal; **fn:** Fossa nuclear; **cc:** Canal citoplasmático.

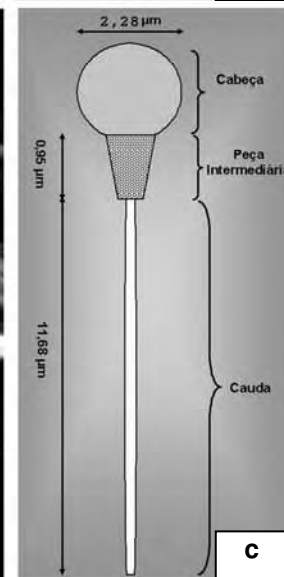
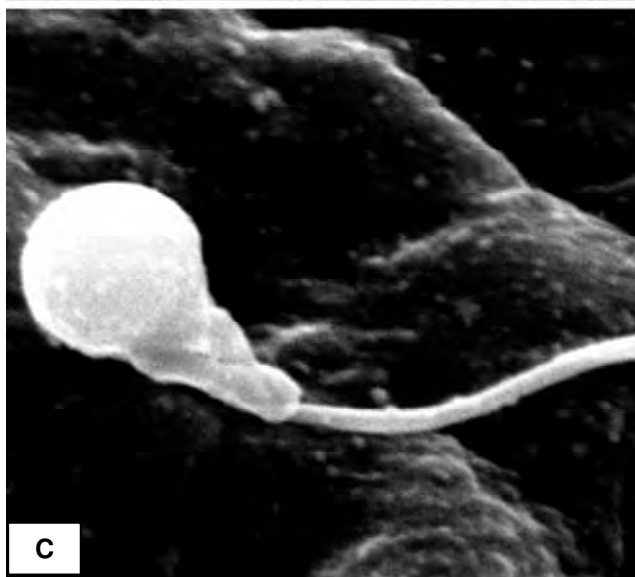
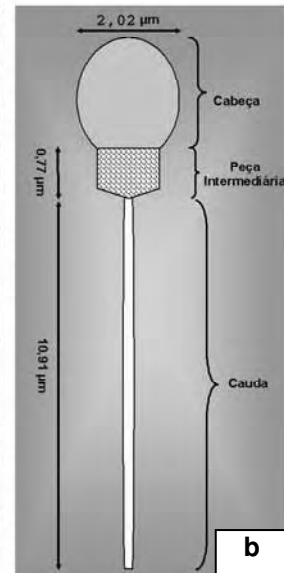
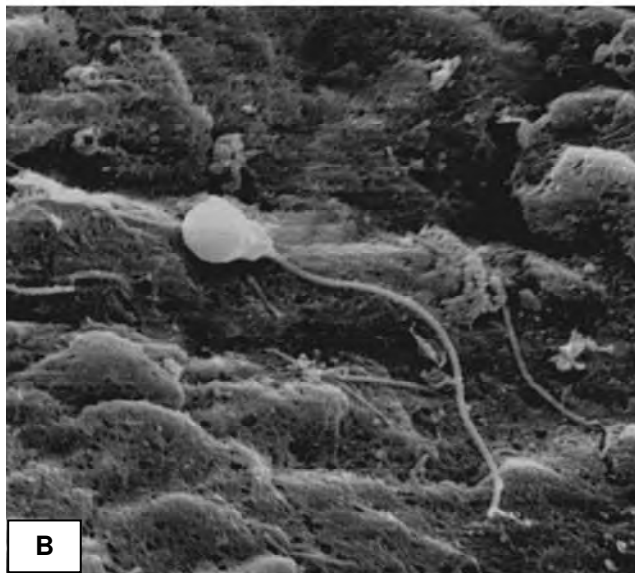
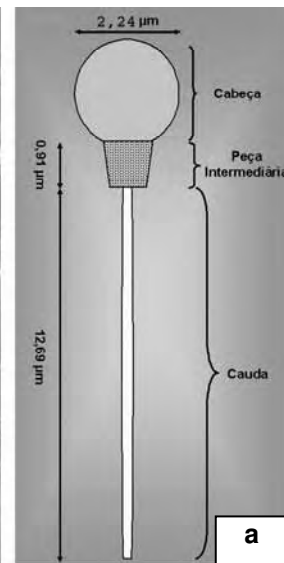
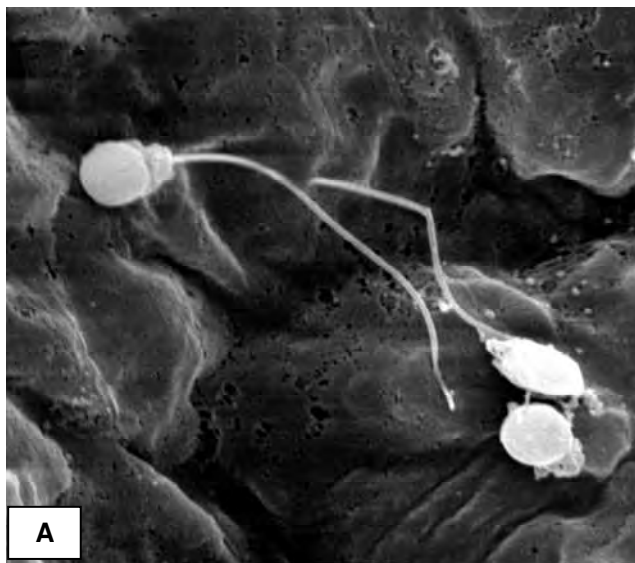


Espermatozóides de Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*, Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques*

Fig. 72. Esquema Comparativo do formato (cabeça, peça intermediária e cauda) dos espermatozóides de Tetra Negro, *G. ternetzi* (**A**), Tetra Amarelo, *H. bifasciatus* (**B**) e Mato Grosso, *H. eques* (**C**).

A, B e C. Elétron micrografias de varredura.

a, b e c. Desenhos esquemáticos.



DISCUSSÃO

1- Características anatômicas dos testículos

Macroscopicamente, as gônadas masculinas de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, foram facilmente distinguíveis nas fases de maturação e de testículo maduro. Dois testículos de similar comprimento foram observados ventralmente à bexiga natatória. Em peixes teleósteos, geralmente, a superfície testicular apresenta-se lisa conforme estudos macroscópicos, realizados por Alexandrino *et al.*, (1985) e Alves do Amaral (1999). No entanto, em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, observou-se por meio de microscopia eletrônica de varredura, superfície irregular, com saliências provocadas pelo aumento de volume dos cistos germinativos, similar aos testículos de *Urophycis brasiliensis* (Viana *et al.*, 2000).

2- Espermatogênese

Os túbulos seminíferos de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* são intercomunicados ou anastomosados, formando uma rede que não termina na periferia testicular. De acordo com Grier (1993), esse tipo de testículo pode ser classificado como “testículo tubular anastomosado”.

As espermatogônias primárias em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, encontram-se distribuídas aleatoriamente ao longo dos túbulos seminíferos, apresentando-se abundantes nas fases iniciais e escassas nas fases mais avançadas de maturação, caracterizando esta distribuição como do tipo testicular espermatogonial irrestrito (Grier *et al.*, 1980; Grier, 1981).

Nas três espécies estudadas, observou-se que a espermatogênese caracteriza-se como cística, considerando que as células germinativas apresentam diferenciação sincrônica no interior dos cistos germinativos, e 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, conforme preconizado por Mattei *et al.*, (1993). Tal fato tem sido observado em outras espécies da Ordem Characiformes (Matos *et al.*, 1998; Romagosa *et al.*, 1999; Aires *et al.*, 2000; Quagio-Grassiotto *et*

al., 2001, 2003; Vicentini, 2002; Cruz-Landim *et al.*, 2003; Pecio, 2003; Veríssimo-Silveira, 2007).

Outra característica do testículo em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, é a ausência de ductos eferentes. Como proposto por Grier *et al.* (1980), no tipo testicular espermatogonial irrestrito, os ductos testiculares eferentes não estão presentes. A ausência de ductos eferentes nestes testículos se deve ao fato de os túbulos seminíferos desembocarem diretamente no ducto testicular principal (Lahnsteiner *et al.*, 1994; Vicentini *et al.*, 2001).

No presente estudo, nas três espécies, não foram observadas variações morfológicas testiculares durante o período do estudo, e a análise histológica evidenciou intensa proliferação celular, com cistos germinativos sempre presentes. Vicentini (2002), estudando *Phalloceros caudimaculatus*, espécie que se caracteriza por apresentar testículo do tipo espermatogonial restrito, e Msiska (2002), em *Oreochromis karongae*, observaram esta mesma característica.

3- Características ultraestruturais das células germinativas.

Características ultraestruturais das células germinativas de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, nas fases iniciais da espermatogênese são muito similares às de outras espécies de peixes teleósteos. As espermatogônias primárias são circundadas por expansões citoplasmáticas das células de Sertoli, independente da fase ou estágio do ciclo reprodutivo em que se encontram (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999; Romagosa *et al.*, 1999, Santos *et al.*, 2001; Vicentini, 2002; Veríssimo-Silveira, 2003, Batlouni *et al.*, 2006).

No citoplasma das espermatogônias é freqüente a presença de estruturas de material elétron-denso, conhecidas como “nuages”. As “nuages” são organelas específicas de células germinativas, que podem apresentar-se livres ou associadas às mitocôndrias, como observado em espermatogônias primárias de *Oryzias latipes* (Hamaguchi, 1993; Lo Nostro *et al.*, 2003). Seu componente principal são ribonucleoproteínas (Toury *et al.*, 1977), e sua função específica é desconhecida

(Hamaguchi, 1993). Mas a sua presença está associada com atividades de síntese neste tipo de células (Lo Nostro *et al.*, 2003).

Em *Poecilia reticulata*, as “nuages” podem ser observadas associadas às mitocôndrias, em espermatogônias primárias e secundárias e em espermatócitos em metáfase, durante a primeira divisão meiótica (Billard, 1984).

Em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, as “nuages” foram abundantes no citoplasma das espermatogônias primárias, algumas perto da membrana nuclear e outras entre mitocôndrias. A quantidade de “nuages” e de mitocôndrias decresceu, enquanto avançava o estágio de desenvolvimento das células germinativas, e só um par de pequenas mitocôndrias foi observado nos espermatozóides, característica típica dos peixes com fertilização externa (Jamieson, 1991).

As estruturas conhecidas como “lamellae annulata” são componentes citoplasmáticos comumente presentes nas células germinativas masculinas, em peixes. Elas são constituídas por um grupo de membranas paralelas empilhadas, com poros semelhantes aos da membrana nuclear (Pudney, 1995). Segundo Kessel (1981), os poros da “lamellae annulata” estão associados com a ativação de produtos gênicos, tais como RNA ribossômico e RNA mensageiro, dispostos na massa citoplasmática. Entretanto não foi observada a presença de “lamellae annulata” em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*.

Gusmão *et al.*, (2002) observaram em *Plagioscion squamosissimus*, a presença de pontes citoplasmáticas ligando as espermatogônias secundárias entre si. As pontes citoplasmáticas são estruturas resultantes de citocineses incompletas e são as responsáveis pelo desenvolvimento sincrônico das células germinativas (Fawcett *et al.*, 1959). A presença de estas pontes é um parâmetro usado para distinguir as espermatogônias secundárias das primárias (Selman e Wallace, 1986). Em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, essas pontes também foram observadas em cistos de espermatogônias secundárias. Porém, tais pontes não foram observadas em cistos de espermatogônias ou de espermatócitos em *Syngnathus abaster* e em *Syngnathus acus* (Carcupino *et al.*, 1999).

Os espermátocitos primários são identificados pela presença dos complexos sinaptonêmicos no núcleo da célula. Estes complexos são estruturas protéicas envolvidas no alinhamento de cromossomos homólogos durante a troca genética. Sua formação em espermátocitos primários de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* é parecida com o reportado por Silveira *et al.*, (1990), Quagio-Grassiotto e Carvalho (1999) e Cunha Negrão *et al.*, (2002)

As divisões meióticas, da espermatogênese, caracteriza-se pela presença de espermátocitos primários e secundários. Segundo Billard (1984), os espermátocitos primários são células que apresentam estruturas nucleares mais complexas que as espermatogônias, com a formação de grumos de cromatina e complexos sinaptonêmicos. Sempre dentro de cistos, estas células sofrem a primeira divisão meiótica originando os espermátocitos secundários, que rapidamente seguem para a segunda divisão resultando nas espermátides. Nas espermatogônias secundárias e espermátocitos, as mitocôndrias, vesículas, complexo de Golgi e centríolos, se localizam geralmente próximos às pontes citoplasmáticas. Estas características também foram observadas em *Hoplias malabaricus* (Cunha Negrão *et al.*, 2002), *Sorubim lima* (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999) em *Plagioscium squasissimus* (Gusmão *et al.*, 2002) e em *Salminus maxillosus* (Veríssimo-Silveira, 2003).

4- Espermiogênese

As principais modificações morfológicas ocorridas nas espermátides de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, durante o período da sua diferenciação, são as mesmas descritas na literatura para outras espécies de Characiformes, e compreendem: alongamento celular, migração das mitocôndrias e dos centríolos, compactação da cromatina, formação da peça intermediária, desenvolvimento da cauda ou flagelo e eliminação do excesso de citoplasma (Mattei *et al.*, 1995; Burns *et al.*, 1998; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001; Veríssimo-Silveira, 2003; Veríssimo-Silveira, 2007).

Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003, observaram que a rotação nuclear afeta a posição da fossa nuclear e, por conseguinte, a união do flagelo ao núcleo do espermatozóide. Quando o núcleo não apresenta rotação, a fossa nuclear é lateral

ou ausente e o flagelo se observa paralelo ao núcleo (Burns *et al.*, 1998; Matos, *et al.*, 2000). Se a rotação é incompleta, a fossa nuclear é excêntrica e o flagelo se apresenta perpendicular ao núcleo (Jamieson, 1991; Burns *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003), mas se a rotação é completa (90°), a fossa nuclear é medial e o flagelo se apresenta medial e perpendicular ao núcleo do espermatozóide (Mattei *et al.*, 1995; Romagosa *et al.*, 1999; Vicentini, 2002; Cruz-Landim *et al.*, 2003; Veríssimo-Silveira, 2003). Em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, a fossa nuclear apresenta-se medial e o flagelo é medial e perpendicular ao núcleo dos espermatozoides.

O padrão de compactação da cromatina no núcleo de espermatozoides de teleósteos depende do tipo de proteína associada ao DNA (Saperas *et al.*, 1993). Em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, a compactação da cromatina mostrou-se de forma homogênea no qual a cromatina é gradativamente compactada, ao longo da espermiogênese, na forma de filamentos justapostos e apresentando áreas elétron-lúcidas. Este tipo de compactação também foi observado em espermatozoides de outras espécies de Characiformes (Burns *et al.*, 1998; Matos *et al.*, 1998; Vicentini, 2002; Gusmão-Pompiani, 2003).

A fossa nuclear é uma depressão encontrada no contorno nuclear voltado para o flagelo (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). Segundo Veríssimo-Silveira (2007), nas espécies em que a fossa nuclear está presente, a profundidade dela pode ser rasa, moderada ou profunda e essa característica determinará a posição do complexo centriolar em relação ao núcleo.

Famílias em que a fossa nuclear está ausente, o complexo centriolar posiciona-se distante ou próximo do núcleo (Matos *et al.*, 2000; Veríssimo-Silveira, 2007). Quando a fossa nuclear é profunda ou moderada, o complexo centriolar encontra-se totalmente inserido dentro dela (Gusmão-Pompiani, 2003). Entretanto, se a fossa nuclear é rasa, pode ocorrer uma variação no posicionamento do complexo centriolar em relação a ela: a primeira opção é que o centríolo proximal se apresente totalmente inserido na fossa nuclear e o centríolo distal, parcialmente inserido (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001; Gusmão-Pompiani, 2003; Veríssimo-Silveira, 2007); uma segunda opção pode ser que o centríolo proximal se apresente

parcialmente inserido na fossa nuclear e o centríolo distal fora dela (Mattei *et al.*, 1995), ou a terceira opção, que o complexo centriolar se apresente totalmente fora da fossa nuclear (Cruz-Landim *et al.*, 2003; Gusmão-Pompiani, 2003). Em *G. ternetzi*, a fossa nuclear apresenta-se rasa, o centríolo proximal se apresenta totalmente inserido na fossa nuclear e o centríolo distal apresenta-se parcialmente inserido.

Nos espermatozóides que apresentam fossa nuclear em arco duplo, os centríolos podem se apresentar fora da fossa (França *et al.*, 2007) ou cada centríolo inserido em um dos arcos (Jamieson, 1991; Gusmão-Pompiani, 2003), como observado em *H. eques* e *H. bifasciatus*.

A disposição do complexo centriolar em teleósteos é variável e em Cipriniformes é considerada uma característica espécie-específica (Mansour *et al.*, 2002). Geralmente o centríolo distal e proximal se organizam entre si formando um ângulo de 90^o (perpendicular), no entanto, dependendo da rotação nuclear das espermátides, o centríolo proximal pode se apresentar paralelo ou oblíquo ao centríolo distal. Em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, os dois centríolos se apresentam perpendiculares um do outro.

A maioria dos espermatozóides *aquaesperm*, descritos em teleósteos, são compostos por cabeça, peça intermediária e flagelo (Jamieson, 1991). Durante a espermiogênese ocorre o deslocamento da massa citoplasmática para a região basal do núcleo, dando origem à peça intermediária do espermatozóide. Esta característica foi observada em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, assim como em outras espécies de teleósteos (Jamieson, 1991; Mattei *et al.*, 1995; Burns *et al.*, 1998; Romagosa *et al.*, 1999; Zaiden, 2000; Aires *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001, 2003; Vicentini, 2002; Cruz-Landim *et al.*, 2003; Gusmão-Pompiani, 2003; França *et al.*, 2007, Veríssimo-Silveira, 2007).

Na peça intermediária estão presentes as mitocôndrias. Elas geralmente são pouco numerosas, pequenas, arredondadas ou alongadas, agrupadas no terço anterior do colar citoplasmático, ao redor do complexo centriolar e do início do axonema, separadas deste pelo canal citoplasmático (Jamieson, 1991; Mattei,

1991). Dentro da ordem Characiformes, a maioria dos espermatozoides são uniflagelados e o flagelo constituído pelo axonema clássico (9+2) (Jamieson, 1991; Mattei, 1991; Romagosa *et al.*, 1999; Aires *et al.*, 2000; Matos *et al.*, 2000; Zaiden, 2000; Vicentini, 2002; Cruz-Landim *et al.*, 2003; Gusmão-Pompiani, 2003; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001, 2003, Veríssimo-Silveira *et al.*, 2006; Veríssimo-Silveira, 2007), similar ao observado nas três espécies estudadas no presente trabalho.

Em alguns Otophysi, os flagelos podem apresentar projeções alares da membrana flagelar ou “fins”, já em Ostariophysi a ausência desta estrutura foi interpretada por Jamieson (1991) como uma sinapomorfia para Characiformes, Cypriniformes e aparentemente para Siluriformes. Segundo Lee e Kim (2001) a ausência destas projeções alares é uma característica comum às ordens Characiformes e Siluriformes. Nas três espécies estudadas, não foram observadas estas projeções alares da membrana flagelar ou “fins”.

De acordo com Afzelius (1979), ao longo da evolução, algumas espécies de peixes perderam o acrossoma, e a razão de este fato não é claro (Matos *et al.*, 1993, 1995). Na literatura aparecem controvérsias sobre a ausência desta estrutura e a principal explicação tem sido dada à presença da micrópila nos ovócitos, a qual facilitaria a entrada do espermatozoide através do córion. No entanto, Cruz-Landim *et al.* (2003), não concordam com que a presença da micrópila nos ovócitos justifique a ausência do acrossoma nos espermatozoides. Em outros grupos de animais, como os insetos, a micrópila está presente e os espermatozoides apresentam acrossoma.

Os espermatozoides de peixes teleósteos possuem características divergentes na sua forma e estrutura (Mattei, 1991), sendo classificados como *aquaesperm* e *introesperm*, característico de peixes que apresentam fertilização externa e interna respectivamente (Jamieson, 1991). Segundo esta classificação, os espermatozoides de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, podem ser classificados como espermatozoides *aquaesperm* apresentando fertilização externa.

Na maioria dos Characiformes que apresentam fertilização externa, seus espermatozoides apresentam núcleos esféricos, apresentando poucas variações em

alguns grupos. Essa característica foi observada nos espermatozóides de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*. Tal fato foi descrito por Jamieson (1991) e Mattei (1991) como característico dos Otophysi de fertilização externa.

Os túbulos seminíferos, em teleósteos, se apresentam separados por tecido conectivo contendo células mióides, vasos sanguíneos e células de Leydig. As células mióides podem apresentar atividade contrátil e devem estar envolvidas na liberação dos espermatozóides do cisto (espermiação) e também em seu transporte para o ducto testicular (Nobrega, 2003). A presença destas células foi observada em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* as quais são de grande importância. Maekawa *et al.* (2000), demonstraram que estas células secretam uma série de substâncias, como componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento, sendo que algumas destas substâncias controlam e/ou mantêm as funções das células de Sertoli. Segundo Grier *et al.* (1989) as células mióides apresentam interações com outras células mióides, com células de Leydig ou com a matriz extracelular, criando uma rede, que auxiliam posteriormente a contração do testículo como um todo para eliminar os espermatozóides. No entanto, estas interações são mediadas por colágeno, que tem como função suporte e não elasticidade. Assim, todas estas interações estariam mais relacionadas com sustentação e não com contração.

Quanto às células de Sertoli, entre os cordados, tem se encontrado duas funções principais: 1) fagocitar células germinativas em degeneração e corpos residuais 2) formar uma barreira testicular (Grier, 1993). Para formar esta barreira testicular, estudos citológicos em teleósteos têm descrito mecanismos de união entre células de Sertoli adjacentes. Durante a espermatogênese, há considerável aumento no volume dos cistos germinativos, devido ao aumento da divisão das células germinativas. Isto é, o citoplasma das células de Sertoli, que faz parte da parede dos cistos germinativos, deve se acomodar a estas mudanças fazendo com que suas uniões sejam flexíveis para manter a integridade da parede do cisto germinativo. Além disso, para manter a integridade do cisto, surgem entre as células de Sertoli, complexos juncionais constituídos por desmossomos e junções de oclusão. Estas últimas junções também têm sido mostradas em várias espécies de teleósteos na formação da barreira hematotesticular (Pudney, 1993). Em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* mais de uma célula de Sertoli forma a parede dos cistos

germinativos apresentando ligações entre elas por desmossomos e junções “tight”. Estas junções provavelmente possuem uma função de barreira hematotesticular, com o objetivo de prover um ambiente propício para o desenvolvimento das células germinativas.

Na análise comparativa das células germinativas em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques*, o maior diâmetro nuclear foi registrado nas espermatogônias primárias, Lo Nostro *et al.*, (2003), estudando a ultraestrutura testicular em *Synbranchus marmoratus*, observaram que o maior diâmetro nuclear foi registrado em espermatócitos primários. Salvo as espermatogônias secundárias, *H. eques* apresentou os menores valores de diâmetro nuclear entre as células germinativas, isto poderia estar relacionado com um número maior de células dentro de cada cisto germinativo. Segundo, Batlouni *et al.*, (2006), a produção de grande quantidade de espermatozóides é uma característica da estratégia reprodutiva em *Pseudoplatystoma fasciatum*. Sendo esta característica comum para as espécies que apresentam desova total e não apresentam cuidado parental (Romagosa *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2001).

Com relação aos dados obtidos sobre a ultraestrutura e morfometria das células germinativas e sua comparação com os dados disponíveis na literatura, observa-se que alguns caracteres apresentam certo grau de variabilidade, até mesmo entre espécies de uma mesma família, como por exemplo, o formato do núcleo, tamanho das células germinativas, a posição do complexo centriolar em relação à fossa nuclear, o arranjo relativo dos centríolos e o formato das mitocôndrias. No entanto, há caracteres conservados em diversos grupos como a ausência de fossa nuclear, do canal citoplasmático e de vesículas na peça intermediária e a presença de projeções laterais e compartimento membranoso nos flagelos.

Desta forma, o conhecimento das características morfológicas e funcionais da espermatogênese, vem sendo utilizado como ferramenta importante para o estudo básico da biologia reprodutiva e para a produção em cativeiro de qualquer espécie íctica, assim como, para o desenvolvimento de técnicas dirigidas à conservação de

espécies nativas e sua aplicabilidade potencial nas análises filogenéticas em diferentes grupos de peixes.

CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado em *Gymnocorymbus ternetzi*, *Hyphessobrycon bifasciatus* e *Hyphessobrycon eques*, pode-se concluir o seguinte:

- Considerando a distribuição das espermatogônias primárias por toda a extensão dos túbulos seminíferos, os testículos de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* correspondem ao tipo espermatogonial irrestrito.
- Embora, os testículos de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* apresentem cistos espermatogênicos com células em diferentes fases da meiose, pode-se considerar sua espermatogênese como sincrônica.
- A espermatogênese em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* é do tipo cística, considerando que os espermatozóides maduros são liberados na luz dos túbulos seminíferos após o processo de espermiogênese.
- As características ultraestruturais das células germinativas durante o processo de espermiogênese em *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* são semelhantes.
- Os espermatozóides de *G. ternetzi*, *H. bifasciatus* e *H. eques* apresentam características ancestrais próprias de peixes com fertilização externa, classificando-os como *anacrosomal aquaesperm uniflagellate*.
- As células de Sertoli, em *G. ternetzi*, *H. eques* e *H. bifasciatus* apresentam função de empacotamento das células germinativas, visando a formação de cistos germinativos.
- A diferença no tamanho (área e diâmetro) dos núcleos das células germinativas, nas três espécies estudadas, pode estar relacionada com a quantidade de espermatozóides produzidos, sendo esta uma característica reprodutiva de espécies com fertilização externa e que não apresentam cuidado parental.

- Este trabalho contribui ao conhecimento das características morfológicas e funcionais das células da linhagem germinativa, como ferramenta importante para o estudo básico da biologia reprodutiva e para a produção em cativeiro destas espécies ícticas, assim como, para o desenvolvimento de técnicas dirigidas à conservação de espécies nativas e sua aplicabilidade potencial nas análises filogenéticas em diferentes grupos de peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afzelius, B.A. Sperm structure in relation to phylogeny in lower metazoo. In: The Spermatozoon. D.W. Fawcett and J.M. Bedford, Eds. Urban and Schwarzenberg, Baltimore. p. 243-251. 1979.

Agostinho, A.A., Julio Jr., H.F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In: Lowe-McConnell, R.H. (Ed.), Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. EDUSP, São Paulo, p. 374–400. 1999.

Aires, E.D.; Stefanini, M.A.; Orsi, A.M. Características ultra-estruturais e diferenciativas das espermátides de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermatogênese. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. v. 37, p. 183-188, 2000.

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. 159-75, 1985.

Alves do Amaral, A. Ciclo reprodutivo anual em machos de *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988) (Pisces, Characiformes, Anostomidae). Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. p. 64. 1999.

Amann, R.P. Physiology and endocrinology. In: Mc Kinnon, A.O.; Voss, J.L. Equine reproduction. Pennsylvania: Lea & Febiger. Cap. 77. p. 658-688, 1993.

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.

Andrews, C. The ornamental fish trade and conservation. J. Fish Biol. v.37a, p. 53-59, 1990

Bartley, D.M. Responsible ornamental fisheries. FAO Aquat. Newsl., v. 24, p. 10–14. 2000.

Batlouni, S.R.; Carreño, F.R.; Romagosa, E.; Borella, M.I. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatum* (Pisces, Siluriformes) J. Mol. Hist. v. 36. p. 97–110. 2005.

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. An. Repr. Sci. v. 96, p. 116–132. 2006.

Berra, T. M. Freshwater Fish Distribution, Academic Press, San Diego – USA. 604 p. 2001.

Beyer, E.C.; Paul, D.L.; Goodenough, A. Connexin family of gap junction proteins. J. Membrane Biol. v. 116. p. 187–194. 1990.

Billard, R. La spermatogènese de *Poecilia reticulata*. IV. La spermiogenese. Etude ultrastructurale. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., v. 10, p. 493-510. 1970.

Billard, R. Changes in structure and fertilising ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. Aquaculture. v.14, 187–198. 1978.

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

Billard, R. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. Cell Tissue Res. v. 273, p. 219-226. 1984.

Boulenger G.A. [An account of a large collection of fishes formed by Dr. C. Ternetz at various localities in Matto Grosso and Paraguay]. Proceeding of the Zoological Society [London] v. 34, p. 523–529. 1895.

Burns, J.R.; Weitzman, S.H.; Lange, K.R.; Malabarba, L.R. Sperm ultrastructure in characid fishes (teleostei, Ostariophysi). 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, p. 235-244. 1998.

Burns, J.R.; Meisner, A.D.; Weitzman, S.H.; Malabarba, L.R. Sperm and spermatozeugma ultrastructure in the inseminating catfish, *Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysi: Siluriformes, Auchenipteridae). Copeia, v.1 p. 173–179. 2002

Carcupino, M.; Baldacci, A.; Corso, G.; Franzoi, P.; Pala, M.; Mazzini, M. Testis structure and symplastic spermatid formation during spermatogenesis of pipefishes. J. Fish. Biol. v. 55. p. 344-353. 1999.

Chao, N.L. and Prang, G. Project Piaba—towards a sustainable ornamental fishery in the Amazon. Aquarium Sci. Conserv., v. 1, p. 105–111. 1997.

Chao, N.L. The fishery, diversity, and conservation of ornamental fishes in the rio Negro basin, Brazil – a review of project PIABA (1989–1999). In: Chao, N.L., Petry, P., Prang, G., Sonneschein, L., Tlusty, M.F. (Eds.), Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil – Project Piaba. Editora da Universidade do Amazonas, Manaus, pp. 161–204. 2001.

Chao, N.L.; Petry, P; Dowd, S. A manutenção e o desenvolvimento sustentável da piscicultura de peixes ornamentais na bacia do médio rio Negro, Amazonas, Brasil. Relatório e informes. 13 p. 2001.

Chao N.L. and Marcon, J.L. Projeto Piaba: Buy a fish save a tree. In: Relatório da Reunião Técnica sobre a pesquisa e ordenamento da pesca de peixes ornamentais na região Norte do Brasil. Brasília. 2003.

Chapman, F.A., Fitz-Coy, S.A., Thunberg, E.M. E Adams, C.M. United States of America trade in ornamental fish. J. World Aq. Soc. v.28, n1, p. 1-10, 1997.

Cheong, L. Overview of the current international trade in ornamental fish, with special reference to Singapore. *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.* v.15, n. 2, p. 445-481, 1996.

Clerot, J.C. Les groupements mitochondriau des cellules germinales des poissons téléostéens cyprinidés. I. Etude ultrastructurale. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 54, 461-475. 1976.

Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dréanno, C. Ionic factors regulating the motility of fish sperm in: *The Male Gamete*. Chapter 16, p. 161-186. 1999.

Cruz-Landim C. and Cruz-Höfling, M.A. Aspectos da esperatogênese de tucunaré, *Cichla ocellaris*. Schneider, 1801 (Teleostei, Cichlidae). *Acta Amazônica*. v. 16/17, p. 65-72. 1986/87.

Cruz-Landim, C.; Abdalla, F.C., Cruz-Hofling, M.A. Morphological of the spermatogenesis in the teleost *Piaractus mesopotamicus*. *Biocell*. v. 27, p. 319-328, 2003.

Cunha Negrão, J.N.; Carvalho, E.D.; Foresti, F. and Quagio-Grassiotto, I. Spermatogonia and spermatocyte ultrastructure in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes: Erythrinidae). *J. Zool., Lond.* v. 257, p. 287-293. 2002.

Dawes, J. International experience in ornamental marine species management. Part 1: perspectives. *Ornamental Fish Int. J.*, 26, February 1999. <http://www.ornamental-fish-int.org/marinespecies1.htm>. 1998.

Dowd, S. and Tlusty, M.F. Project Piaba—working toward a sustainable natural resource in Amazon freshwater fisheries. *Endangered Species Update* 17, 88– 90, Univ. MI. School Natural Resources. 2000.

Eigenmann, C. H. The American Characidae. *Memoirs of Museum of Comparative Zoology*, v. 53 n.1, p. 1-102. 1917.

Ellis, M.D. On the species of *Hasemania*, *Hyphessobrycon*, and *Hemigrammus* collected by J. D. Haseman for the Carnegie Museum. *Ann. Carnegie Mus.*, v. 8, n. 1, p. 148-163, 3 pls. 1911.

FAO, Food and Agriculture Organization. United Nations Fishery statistics. June 2005 report. <http://faostat.fao.org/>. 2005.

FASS - Florida Agriculture Statistical Service. Aquaculture. www.nass.usda.gov/fl. June 1999.

Fawcett, D.W.; Ito, S.; Slauterback, D.L. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* v. 5, p. 453-460. 1959.

Fraile, B., Sáez, F.J., Vicentini, C.A. De Miguel, M.P., Paniagua, R. The testicular cycle of *Gambusia affinis holbrooki* (Teleostei: Poecillidae), *J. Zool.*, v. 228, p. 115-126, 1992.

- França, L.R. and Russell, L.D. The testis of domestic animals. *In: Male reproduction: a multidisciplinary overview.* pp. 198–219. Edited by F. Martínez-García and J. Regadera, Churchill Communications, Madrid. 1998.
- França, G.F.; Oliveira, C.; Quagio-Grassiotto, I. Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Gymnotus cf. anguillaris* and *Brachyhyppopomus cf. pinnicaudatus* (Teleostei: Gymnotiformes) *Tissue & Cell.* v. 39. p.131–139. 2007.
- Franzén, Å. Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. *In: Comparative Spermatology* (Baccetti, B., ed.). p. 29-45. New York: Academic Press. 1970.
- Geiser, S.W. Seasonal changes in the testis of *Gambusia affinis*, the top-minnow. *Anat. Rec.*, v. 23, p. 104-105, 1922.
- Geiser, S.W. sex-ratios and spermatogenesis in the top-minnow, *Gambusia affinis holbrooki*. *Biol. Bull.*, v. 47, p.175-213, 1924.
- Géry, J. Characoids of the world. Neptune City, T.F.H. Publications, 672 p. 1977.
- Grandi, G. and Colombo, G. Developmental and early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla anguilla* [L], Anguilliformes, Teleostei), A cytological and ultrastructural study. *J. Morphol.* v. 231 p. 195-216, 1997.
- Grier, H.J. and Linton, J.R. Ultrastructural identification of the Sertoli cell in the testis of the northern pike, *Esox lucius*. *Amer. J. Anat.*, v. 149, p. 283-288, 1977.
- Grier, H.J.; Fitzsimons, J.M.; Linton, J.R. Structure and ultrastructure of the testis and sperm formation in Goodeid teleost. *J. Morphol.*, v. 156, p. 419-438, 1978.
- Grier, H.J.; Linton, J.R.; Leatherland, J.F.; Vlaming, V.L. Structural evidence of two different testicular types in teleost fishes. *Am. J. Anat.* v. 159, p. 331–345. 1980.
- Grier, H.J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.*, v. 21, p. 345-357. 1981.
- Grier, H.; Van den Hurk, R.; Billard, R. Cytological identification of cells type in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. *Cell Tissue Res.* v. 257. p. 491-496. 1989.
- Grier, H.J. Chordate Testis: The extracellular matrix hypothesis. *J. Exper. Zool.*, v. 261, p. 151-160, 1992.
- Grier, H.J., Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. *In: Russel, L.D., Griswold, M.D. (Eds.), The Sertoli Cell.* Cache River Press, p. 704–739. 1993.
- Griswold, M. D. Protein secretions of Sertoli cells. – *International Review of Cytology.* v. 110. p. 133–156. 1988.

- Gusmão, P., Foresti, F., Quaggio-Grassiotto, I., Ultrastructure of spermiogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). *Tissue Cell*, v. 31, n. 6, p. 627–633. 1999.
- Gusmão, P., Foresti, F., Quaggio-Grassiotto, I., The ultrastructure of the pre-meiotic and meiotic stages of spermatogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Scianidae). *J. Sbmicrosc. Cytol. Pathol.* v. 34. p. 159-165. 2002.
- Gusmão-Pompiani, P.G. Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de peixes da Ordem Characiformes, Família Characidae (Teleostei, Ostariophysi): uma abordagem filogenética. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2003.
- Gwo, J.C., Chiu, J.Y., Lin, C.Y., Su, Y., Yu, S.L. Spermatozoal ultrastructure of four Sparidae fishes: *Acanthopagrus berda*, *Acanthopagrus australis*, *Lagodon rhomboids* and *Archosargus probatocephus*. *Tiss. and Cell.* v. 37. p. 109–115. 2005.
- Halachmi, I. Systems engineering for ornamental fish production in a recirculating aquaculture system *Aquaculture*. v. 259, p. 300–314. 2006.
- Hamaguchi, S., Alterations in the morphology of nuages in spermatogonia of the fish, *Oryzias latipes*, treated with puromycin or actinomycin. *Reprod. Nutr. Dev.* v. 33, p. 137–141. 1993.
- Hann, H.W. The history of the germ cells of *Cottus bairdii* Girard. *J. Morphol.* v.43, p. 427-497, 1927.
- James, M.F. Histology of gonadal changes in the blue-gill, *Lepomis macrochirus rafinesuqe*, and the largemouth bass, *Huro salmoides*. *J. Morphol. Physiol.*, v. 79, p. 63-89, 1946.
- Jamieson, B.G.M. Fish Evolution and Systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press. 317 p., 1991.
- Javonillo, R.; Burns, J.R.; Weitzman, S.H. Reproductive morphology of *Brittanichthys axelrodi* (Teleostei: Characidae), a miniature inseminating fish from South America. *J. Morphology*. v. 268, p. 23-32, 2007.
- Jones, J.W. Histological changes in the testis in the sexual cycle of male salmon parr (*Salmo salar* L. Juv.). *Proc. Roy. Soc.*, v. 128, p. 499-509, 1940.
- Jones, P.R. and Butler, R.D. Spermatozoon ultrastructure of *Plastichtys flesus*. *J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res.*, v. 98, p. 71-82, 1988.
- JSA, U.S. private aquaculture production of 1985 – 1997. Ag, www.ansc.purdue.edu/aquanic/jsa/aquaproduct.htm. February 1999.
- Karnovsky, M.J., A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v. 27, p. 137a. 1965.

- Kessel, R.G. Origin, differentiation, distribution and possible functional role of annulate lamellae during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. J. Ultrastruct. Res. v. 75, p. 72-96. 1981.
- Lahnsteiner, F.; Patzner, R.A.; Weismann, T., The testicular main ducts and spermatic ducts in cyprinid fishes. I. Morphology, fine structure and histochemistry. J. Fish Biol., v. 44, p. 937–951. 1994.
- Lee, Y.H. and Kim, K.H. The Ultrastructure of spermatozoa of the slender catfish, *Silurus microdorsalis* (Teleostei, Siluriformes, Siluridae) J. Submicrosc. Cytol. Pathol. v.33, n. 3. p. 329-336. 2001.
- Lima, R.L.V.A.; Val-Sella, M.V.; Torquato, V.C. Organização e desenvolvimento das gônadas do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) durante o ciclo reprodutivo. Bol. Fisiol. Anim. Univ. S. Paulo. v.10, p. 139-154, 1986.
- Lima, F.C.T.; Malabarba, L.R.; Buckup, P.A.; Pezzi da Silva, J.F.; Vari, R.P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakawa, O.T.; Pavanelli, C.S.; Menezes, N.A.; Lucena, C.A.S.; Malabarba, M.C.S.L.; Lucena, Z.M.S.; Reis, R.E.; Langeani, F.; Casatti, L.; Bertaco, V.A.; Moreira C.; Lucinda, P.H.F. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. Pp. 106-169. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr, C.J. (Eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, 729p. 2003.
- Loir, M.; Sourdain, P.; Mendis-Handagama, S.M.; Jegou, B. Cell-cell interactions in the testes of teleosts and elasmobranchs. Microsc. Res. Tech., v.6, p. 533-552. 1995
- Lo Nostro, F.; 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. 2003.
- Maekawa, M.; Kamimura, K.; Nagano, T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. Arch. Histol. Cytol. v. 59. p. 1-13. 2000.
- Mansour, N.; Lahnsteiner, F.; Patzner, R.A. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. J. Fish Biol. v. 60. p. 545-560. 2002.
- Matos, E.; Matos, P.; Oliveira, R.; Azevedo, C. Ultraestrutura do espermatozóide do pacu, *Metynnis maculatus* Kner, 1960 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. Rev. Bras. Ciênc. Morfol. 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. Bras. J. Morphol. Sci. v.12 n. 2. p. 109-114. 1995.
- Matos, E.; Matos, P.; Santos, M.N.S.; Azevedo, C. Aspectos morfológicos e ultraestruturais do espermatozóide de *Curimata inosnata* Vari, 1989 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. Acta Amaz. v. 28. p. 449-453. 1998.

- Matos, E.; Matos, P.; Corral, L.; Azevedo, C. Estrutura fina do espermatozóide de *Acestrorhynchus falcatus* Bloch (Teleostei, Characidae) da região norte do Brasil. – Rev. Bras. Zool. v. 17. p. 747–752. 2000.
- Mattei, X. Spermio-genèse comparée des poisson. In: Baccetti, B. (Ed) Comparative Spermatology. Academic Press, New York. p. 57-70. 1970.
- Mattei, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. Can. J. Zool. v. 69, p. 3038-3055. 1991.
- Mattei, X. Siau, Y., Thiaw, O.T., Thiam, D. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces, Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. J. Fish Biol., v. 43, p. 931-937, 1993.
- Mattei, X.; Marchand, B.; Thiaw, O.T. Unusual midpiece in the spermatozoon of the teleost fish, *Citharinus* sp. J. Sub. Cytol. and Pathol. v. 27. p. 189–191. 1995.
- Mendoça, G. The reproductive cycle of the viviparous teleost, *Neoteca bilineata*, a member of the family Gooderdae. IV The germinal tissue. Biol. Bull., v.84, p. 87-97, 1943.
- Miura, T. Spermatogenetic Cycle in Fish. In: Knobil, E. & Neill, J.D. editors. Encyclopedia of Reproduction. San Diego: Academic Press. v. 4, p. 571-578, 1999.
- Msiska, O.V. The histology of mature gonads of *Oreochromis (Nyasalapia) karongae* (Trewavas) East African Wild Life Society, Afr. J. Ecol. v. 40. p. 164-171, 2002.
- Nakatani, K.; Agostinho, A.A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C.; Pavanelli, C.S. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: Eduem, 378p. 2001.
- Nelson, J.S. "Fishes of the World," 4th ed. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 601p. 2006.
- Nobrega, R.H. Capacidade das células de Sertoli e alterações do epitélio germinativo masculino e do tecido intersticial durante o ciclo reprodutivo de peixes neotropicais. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2003.
- OFI. The official website of the Ornamental Fish International organization at <http://ornamental-fish-int.org>. 2003.
- Paniagua, R.G.A.; Nistal, M.M.S.; Pilar, M.S.E.; Alvarez-Uria, M.R.V.; Alvarez, R.A.; Fraile, B.L.; Sáez, F.J.C.; De Miguel, M.P.G. Citologia e Histologia Vegetal y Animal. Madrid, Mc Graw-Hill – Interamericana de España, S.A., 970 p. 1997.
- Patzner, R.A. Morphology of the male reproductive system of *Coralliozetus angelica* (Pisces, Blennioidei, Chaenopsidae) J. Fish Biol., v.39, p. 867-872, 1991.

- Pecio, A. Spermiogenesis and fine structure of the spermatozoon in a Headstander, *Chilodus punctatus* (Teleostei, Characiformes, Anostomidae). *Fobia Biol.* (Kraków). v. 51. p. 55-62. 2003.
- Pelicice, F.M. and Agostinho, A.A. Perspectives on ornamental fisheries in the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Fisheries Research* v. 72, p. 109–119. 2005.
- Plöen, L., and Courtneys, J.L. Comparative aspects of mammalian spermiogenesis. *Scan. Elect. Microsc.*, v.2, p. 107-120, 1986.
- Pudney, J. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: Rusell, L.D., Griswold, M.D. (Eds.), *The Sertoli Cell*. Cache River Press, USA. p. 611–657 (Chapter 30). 1993.
- Pudney, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.*, v. 6, p. 459-497. 1995.
- Quagio-Grassiotto, I. and Carvalho, E.D. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermiogenesis: premeiotic and meiotic periods. *Tiss. 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. 1494-1502. 2001.
- Quagio-Grassiotto, I.; Gameiro, M.C.; Schneider, T.; Malarba, L.R.; Oliveira, C. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the Curimatae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the Characiformes. *Neotropical Ichthyology*. v. 1, n. 1. p. 35-45. 2003.
- Rastogi, R.K. Histology and seasonal changes of spermary of the garfish *Xenotodon cancila*. *Anat. Anz.*, v. 122, p. 353-366, 1968.
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* v. 17, p. 208-212. 1963.
- Robins, C.R.; Bailey, R.M.; Bond, C.E.; Brooker, J.R.; Lachner, E.A.; Lea, R.N. and Scott, W.B. World fishes important to North Americans. Exclusive of species from the continental waters of the United States and Canada. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* v. 21, 243 p. 1991.
- Romagosa, E. Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento. 177f. Tese – Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro. 1991.
- Romagosa, E.; Narahara, M.Y.; Borella, M.I.; Parreira, S.F.; Fenerich-Verani, N. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). *Tiss. Cell*. v. 31, n. 6, p. 540-544. 1999.

- Roscoe, W.A.; Barr, K.J.; Mhawi, A.A.; Pomerantz, D.K.; Kidder, G.M. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin 43. *Biol. Reprod.* v. 65, n. 3. p. 829–838. 2001.
- Ruby, S.M. and Mc Millan, D.B. Cyclic changes in the testis of the brook stickleback *Eucalia incostans* (Kirtland). *J. Morph. Physiol.*, v. 131, p. 447-465, 1970.
- Santos, J.E.; Bazzoli, N.; Rizzo, E.; Santos, G.B. Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheingichthys labrosus* (Lutken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue & Cell.* v. 33. p. 533-540. 2001.
- Saperas, N.; Ribes, E.; Buesa, C.; Garcia-Hegart, F.; Chiva, M. Differences in chromatin condensation during spermiogenesis in two species of fish with distinct protamines. *J. Exp. Zool.* v. 265. p. 185–194. 1993.
- Schulz, R.W. and Miura, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish. Phys. Bioch.* v. 26. p. 43-56. 2002.
- Selman, K., and Wallace, R.A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *Am. Zool.*, v. 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). *Act. Zool. (Stockholm)*. v. 87. p. 215–227. 2006.
- Shanbrag, A.B. and Nadkarni, V.B. Histological and histochemical studies on the testicular cycle of a fresh water teleost *Channa gachua* (Hamilton). *Anat. Anz.*, v. 146, p. 381-389, 1979.
- Silveira, H.; Rodrigues, P.; Azevedo, C. Fine structure of the spermatogenesis of *Blennius pholis* (Pisces, Blenniidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* v. 22. p. 103-109. 1990.
- Srivastava, S.S. Histomorphology and seasonal cycle of the spermary and sperm duct in a teleost *Notopterus notopterus* (Pallas). *Acta Anat.*, v. 66, p. 133-160, 1967.
- Steindachner, F. Ichthyologische Beiträge (XII). Sitz. Akad. Wiss. Wien, part 1, v. 86 p. 61-82. 1882.
- Stoumboudi, M.Th. and Abraham, M. The spermatogenic process in *Barbus longiceps*, *Capoeta damascina* and their natural sterile hybrid (Teleostei, Cyprinidae). *J. Fish Biol.* v. 49, p. 458-468. 1996.
- Suquet, M.; Dreanno, C.; Dorange, G.; Normat, Y.; Quemner, L.; Gaignon, J.L.; Billard, R. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilisation, and storage capacities. *J. Fish Biol.* v. 52, p. 31–41. 1998.

Thiaw, O.T.; Mattei, X.; Ndiaye, M. Unusual syncytial structure of the germ cells in the Cyprinodontidae *Aphyosemioncameronense* (Pisces, Teleostei). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* v. 27, p. 375-380. 1995.

Trusty, M. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, v. 205 p. 203– 219, 2002.

Toury, R., Clérot, J.C., André, J. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons teleostéens cyprinides. IV Analyses biomique des constituants du “ciment” intermitochondrial isolé. *Biol. Cell.*, v.30, p. 225-232, 1977.

Turner, C.L. The seasonal cycle in the spermary of the perch. *J. Morphol.* v.32, p. 681-711, 1919.

Van Winkoop, A.; Booms, G.H.R.; Dulos, G.J.; Timmermans, L.P.M. Ultrastructural changes in primordial germ cells during early gonadal development of common carp. (*Cyprinus carpio* L., Teleostei). *Cell Tissue Res.* v. 267, p. 337-346. 1992.

Vaupel J. The spermatogenesis of *Lebistes reticulatus* J. *Morphol.*, v. 47, p.555–587. 1929.

Veríssimo-Silveira, R. Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do Dourado (*Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849). Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura- Jaboticabal. 2003.

Veríssimo-Silveira, R.; Gusmão-Pompiani, P.; Vicentini, C.A.; Quagio-Grasiotto, I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). *Acta Zool.* v. 87, p. 305-313, 2006.

Veríssimo-Silveira, R. Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da Subordem Characoidei (Teleostei, Characiformes): uma abordagem filogenética. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatú. 2007.

Viana, F.; Acuña, A.; Berois, N.; Danulat, E. Testes morphology and reproductive aspects of male Brazilian codling (*Urophycis brasiliensis* Kaup 1858). *J. Appl. Ichthyol.* v. 16. p. 134-135. 2000.

Vicentini, C.A.; Franceschini-Vicentini, I.B.; Orsi, A.M.; Benetti, E.J. Testicular ultrastructure and morphology of the seminal pathway in *Prochilodus scrofa*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 33, n. 3. p. 357-362, 2001.

Vicentini, C.A. Estrutura comparativa da espermatogênese em peixes neotropicais, *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* e *Phalloceros caudimaculatus* (Pisces, Teleostei). Tese (Livre – Docência) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências – UNESP – Bauru. 2002.

Vilela, D.A.R.; Silva, S.G.B.; Peixoto, M.T.D.; Godinho, H.P. and França L.R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiol. and Bioch.* v. 28. p. 187–190. 2003.

Weitzman, S.H. and Palmer, L. A new species of *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from Neblina region of Venezuela and Brazil, with comments on the putative 'rosy tetra clade'. *Ichthyol. Explor. Freshwat.*, v.7, n. 3. p.209-242. 1997.

Weltzien, F.A.; Andersson, E.; Andersen, Ø.; Shalchian-Tabrizi, K.; Norberg, B. The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes), *Comp. Bioch. and Physiol. Part A* v. 137 p. 447–47. 2004.

Zaiden, S.F. Morfologia gonadal e metabolismo energético da Piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativero, durante o ciclo reprodutivo anual. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura – Jaboticabal - SP. 152 p., 2000.