Carlos Alberto Vicentini

ESTRUTURA COMPARATIVA DA ESPERMATOGÊNESE EM PEIXES NEOTROPICAIS, *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* e *Phalloceros caudimaculatus* (Pisces, Teleostei)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Bauru, para obtenção do Título de Livre - Docente, na Disciplina de Anatomia Humana e Animal, junto ao Departamento de Ciências Biológicas.

BAURU - SP
2002

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

Cod. Cajas - 2000006
- Espermatogênese - Peixes
- Peixes de água doce - Espermatogênese

Carlos Alberto Vicentini

Número de chamada
Clas. T / UNESP
PHA V 682e
Tombo n.º 1.183

ESTRUTURA COMPARATIVA DA ESPERMATOGÊNESE EM PEIXES NEOTROPICAIS, *Prochilodus scrofa, Astyanax scabripinnis* e *Phalloceros caudimaculatus* (Pisces, Teleostei)

BIBLIOTECA - UNESP - CAMPUS BAURU

Tese apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Bauru, para obtenção do Título de Livre – Docente, na Disciplina de Anatomia Humana e Animal, junto ao Departamento de Ciências Biológicas.

BAURU - SP
2002

Ficha catalográfica elaborada por
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - Bauru

Vicentini, Carlos Alberto
Estrutura comparativa da espermatogênese em peixes neotropicais: *Prochilodus scrofa, Astyanax scabripinnis e Phalloceros caudimaculatus* (pisces, teleostei) / Carlos Alberto Vicentini - - Bauru : [s.n.], 2002.
102 f.

Tese (Livre - Docência) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências.

1. Espermatogênese. 2. Peixes neotropicais. 3. Estrutura comparativa. 4. *Prochilodus scrofa*. 5. *Astyanax scabripinnis*. 6. *Phalloceros caudimaculatus*. I – Título. II – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências.

O ADEUS

Se duas criaturas que se estimam tanto
o destino programa uma inesperada separação,
quem sofre mais,
quem parte para uma terra estranha
ou quem fica no seu próprio pátrio torrão?

Dizei-o vós, psicólogos,
que em cada dia nos dais uma nova lição.
Dizei-o vós, que entendeis os anseios d' alma
e conheceis os segredos do coração.

Os poetas...esses eternos sonhadores
que sabem entender o que dizem as estrelas;
que são capazes de decifrar
a secreta linguagem das mais exóticas flores;
sentem-se pequenos quando proferem
uma definição do lacrimoso adeus
entre dois entes que se querem...

O adeus...o que é o adeus?
- *um acenar de mãos,*
- *um agitar de lenços,*
- *uma lágrima dorida,*
- *um sentido soluço,*
- *outro soluço mais que se intensifica.*

Adeus – saudades para quem parte!
Adeus – nostalgia para quem fica!

Humberto Vicentini *(In Memorian)*

Obrigado meu querido Avô, pois adormeci em seus braços quando criança,
e na juventude aprendi muito com seus sábios conselhos.

FILHOS

"Feliz o filho que nasce de uma boa família"

Vós que tivestes a sorte
de terdes nascido
num lar bem constituído,
trazei sempre em vossa memória,
(nem sequer um dia vos esqueçais),
todo o bem que recebestes de vossos pais.

Na vossa trajetória de vida,
cultivando todas as virtudes,
cultivai com todo esmero
a que brota do coração:
cultivai a gratidão.

Em nossos dias
é doloroso ver-se
tantos pais, infelizes, abandonados...
Filhos, fazei de vosso coração
um coração magnânimo:
fazei tudo para que sejam reabilitados.
Praticando uma das ações mais puras:
dareis belo exemplo a vossos contemporâneos
e sereis lembrados pelas gerações futuras...

(Humberto Vicentini)

Àqueles de minha família, que muito amo, prezo e respeito

Aos Meus Pais:

Humberto Vicentini Filho

e ***Dalva Figueiredo Vicentini***

Aos Meus Sogros:

Licurgo José Franceschini

e ***Irene Gonçalves Bastos Franceschini***

À minha querida esposa ***Irene,***
pelo amor, carinho, respeito
e principalmente por compreender, compartilhar
e fazer parte de meus ideais.

Ao meu filho ***Felipe,***
presente abençoado de Deus,
que dá sentido à minha busca de conhecimento e crescimento.

Muito Obrigado, ***Irene*** *e* ***Felipe***
pela alegria e força espiritual,
para que eu possa continuar,
mesmo diante dos maiores obstáculos.

Mestre, dissílabo de fácil pronúncia,
expressa uma palavra
de inestimável valor.
Pela ternura dedicada aos alunos,
"Mestre", bem mereceria
ser sinônimo de amor!

(adaptado de poemas de Humberto Vicentini)

Ao Prof. Dr. ***ANTONIO MARCOS ORSI***

Minha grande admiração e eterna gratidão
pelo exemplo de conduta humana e profissional,
e pelos valiosos ensinamentos que possibilitaram
esta importante conquista.

Agradecimentos

- Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências do Câmpus de Bauru – UNESP, pela infra-estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

- 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.

- Ao Centro de Aqüicultura da UNESP – CAUNESP, pelo apoio técnico e científico.

- Ao Prof. Dr. ANTONIO MARCOS ORSI pela disponibilidade constante e importantes sugestões no decorrer deste trabalho.

- À Profa. Dra. IRENE BASTOS FRANCESCHINI VICENTINI, pelo grande apoio e incentivo durante toda minha carreira universitária e principalmente para a conclusão deste trabalho.

- À Profa. Dra. MARIA TEREZINHA SIQUEIRA BOMBONATO e ao Engenheiro Agrônomo LUIZ BOMBONATO FILHO, pelo apoio, incentivo sugestões e amizade.

- Ao Prof. Dr. WAGNER COTRONI VALENTI pelo grande apoio e incentivo para a realização deste trabalho e principalmente junto ao Centro de Aqüicultura da UNESP – CAUNESP.

- Ao Prof. Dr. JEHUD BORTOLOZZI, pelo estímulo durante a realização deste trabalho e principalmente pelo apoio na implantação do Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências do Câmpus de Bauru – UNESP.

- Aos Docentes e Funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências do Câmpus de Bauru - UNESP, pelo grande apoio.

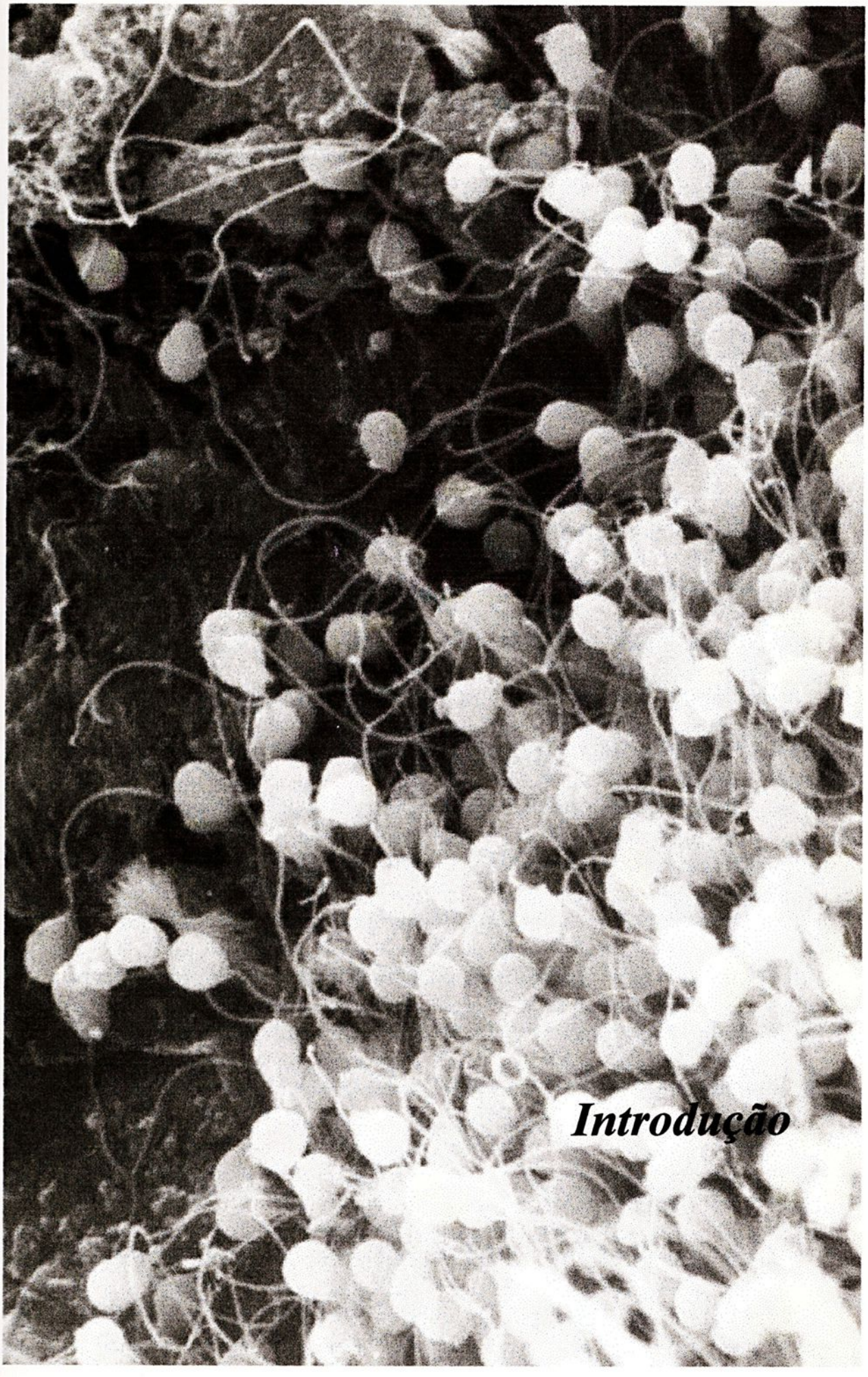
- Aos meus Orientandos e Alunos de Graduação em Licenciatura em "Ciências Biológicas" e "Educação Física", pelo carinho e amizade.

- Aos Amigos que estiveram e estarão sempre presentes.

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

SUMÁRIO

Introdução	01
Literatura	07
1- Estrutura testicular e características das células germinativas	08
2- Características das células de Sertoli	20
3- Características do ciclo reprodutivo	22
Material e Métodos	25
1- Análise macroscópica dos testículos	26
2- Análise microscópica dos testículos	27
3- Análise ultraestrutural da espermatogênese	28
Resultados	30
1- Características macroscópicas dos testículos	31
2- Características microscópicas dos testículos	32
3- Características ultraestruturais da espermatogênese	35
Discussão	60
Conclusões	74
Referências Bibliográficas	78
Resumo	97
Abstract	100



Introdução

A aqüicultura envolve o processo de produção em cativeiro de organismos com habitat predominantemente aquático, em quaisquer estágios de desenvolvimento, sejam ovos, larvas, pós-larvas, indivíduos juvenis, ou adultos (PADUA, 2001). A aqüicultura brasileira apresenta seis setores principais de produção, englobando o manejo e estudos de peixes de água doce, camarões marinhos, mexilhões, ostras, camarões de água doce e rãs (VALENTI et al., 2000).

Estas atividades vêm apresentando mundialmente, crescimento significativo nos últimos anos, principalmente nos países em desenvolvimento. Atualmente, são responsáveis, por exemplo, pela produção de 36 milhões de toneladas anuais de pescado (OSTRENSKY et al., 2000). A aqüicultura pode desempenhar um papel sócio-econômico importante, criando condições para aproveitamento mais efetivo dos recursos locais, originando novos nichos econômicos, e promovendo oportunidades para novos investimentos. Isto com ganhos expressivos para a economia regional e nacional (BAILEY, 1997). Ressaltamos ainda, que esta atividade trata da produção de alimento de alta qualidade, com relativo baixo custo, e contribui para a geração de novos empregos.

unesp

Ao contrário das atividades agropecuárias tradicionais, em que se cultiva reduzido número de espécies animais, pelo menos quarenta espécies vêem sendo utilizadas, comercialmente ou experimentalmente, na piscicultura brasileira (PADUA, 2001). Dentre as espécies utilizadas, destacamos o *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Characiformes, Prochilodontidae) e o *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Characiformes, Characidae).

O *Prochilodus scrofa*, popularmente conhecido como curimbatá, é uma espécie que vem despertando interesse para a aqüicultura devido ao seu hábito alimentar (iliófago), à sua taxa elevada de fecundidade e ao bom desempenho zootécnico (LEITE, 1984). Pertence à família *Prochilodontidae* com ampla distribuição geográfica (FOWLER, 1951), sendo um peixe bem consumido, principalmente nas cidades do interior paulista, devido ao bom potencial de captura e sabor de sua carne (ROMAGOSA et al., 1985). GODOY (1954), relata que a atividade migratória reprodutiva dos cardumes desta espécie, no rio Mogi-Guaçu, realiza-se de novembro a fevereiro, sendo que a desova ocorre de modo parcial, coincidindo com as grandes chuvas e elevação do nível do rio.

Segundo ROMAGOSA et al. (1985), uma vez que esta espécie habita águas de correntezas, quando é colocada em tanques ou represas,

unesp

embora apresente desenvolvimento dos ovários (SCHUBART, 1947; GODOY, 1954), não desova naturalmente. Logo, é necessário a indução à reprodução por meio de hipofisação ou de injeção de hormônios gonadotróficos (CASTAGNOLLI & CYRINO, 1980; FENERICH-VERANI et al., 1984).

Quanto ao gênero *Astyanax*, encontra-se no Brasil aproximadamente 250 espécies, sendo as mais comuns a *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax scabripinnis* e *Astyanax eigenmanniorum* (FÁVARO, 2002). Na Amazônia são conhecidos por "matupiris"; em todo o Nordeste e no litoral até o Rio de Janeiro dá-se-lhes o nome de "piaba", em São Paulo e Minas Gerais são chamados de "lambaris" (IHERING, 2002). Quanto ao *Astyanax bimaculatus*, ANDRADE et al. (1985) relatam que apesar de seu pequeno porte é muito apreciado por sua carne saborosa, o que o torna potencialmente útil à piscicultura intensiva.

A busca por informações sobre a criação; reprodução e comercialização de lambaris é crescente e levou o Instituto de Pesca da Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento de São Paulo a promover, em março de 2002, o primeiro curso sobre o tema, conforme reportagem de FÁVARO (2002). Segundo BARBIERI, In FÁVARO

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

(2002), a venda de lambaris para alimentar peixes carnívoros já é comum aproximadamente há dez anos no Estado de São Paulo, mas o cultivo tem registrado crescimento somente nos últimos cinco anos. A procura pelo peixe de carne saborosa tem crescido por seu valor agregado e para povoamento em pesqueiros. As qualidades do lambari são muitas. Segundo o pesquisador é um peixe oportunista, adaptando-se facilmente aos ambientes e aceitando uma variedade grande de alimentos. Por ser onívoro, desova mais de uma vez ao ano e sua reprodução pode ser induzida, apresentando alta taxa de fecundidade, com elevado índice de crescimento.

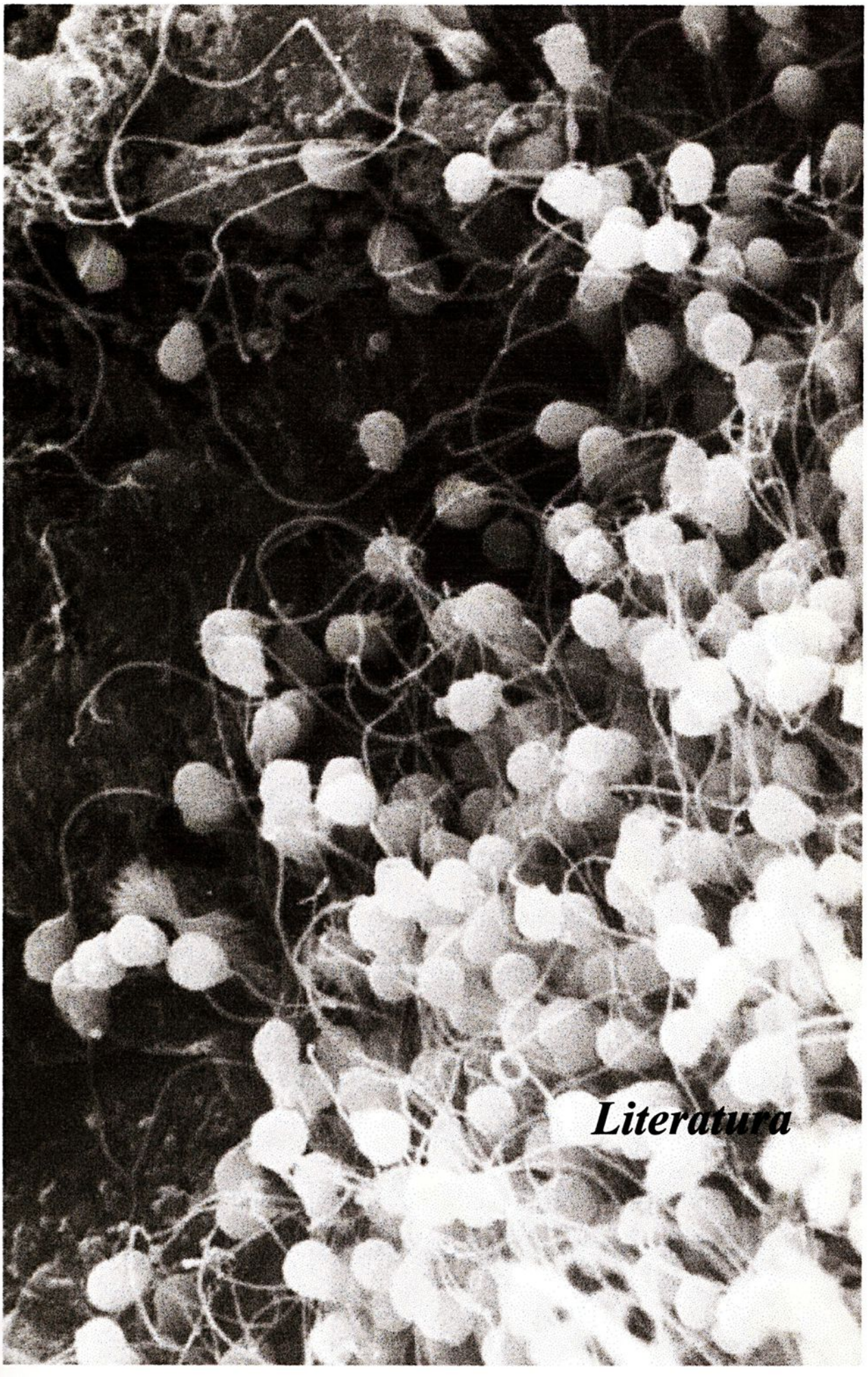
Concernente ao *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae), popularmente denominado "barrigudinho", IHERING (2002) destaca que o gênero *Phalloceros* é o mais abundante em todo o litoral brasileiro, sendo a espécie em estudo, a mais comum no Estado de São Paulo. Durante algum tempo esta espécie teve a fama de ser útil no combate às moléstias transmitidas pelos mosquitos, dentre elas a febre amarela. Segundo IHERING (2002), foi demonstrado que esta espécie, em sua região natural, só excepcionalmente se alimenta de larvas de Culicídeos. Porém, muito superiores a essa e outras espécies são os lambaris que prestam ótimos serviços como larvófagos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Cabe destacar que os poecilídeos são peixes que apresentam fecundação interna. Devido ao seu pequeno porte foram utilizados para estudos do ciclo reprodutivo (FRAILE et al., 1992), e também para avaliar o efeito do fotoperíodo na espermatogênese, durante o período de quiescência testicular (FRAILE et al., 1993). Ademais verificou-se a influência da fotorecepção ocular, e extraocular, na espermatogênese (DE MIGUEL et al., 1994).

Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho foi o de analisar, comparativamente, a estrutura da espermatogênese, destas três espécies de peixes neotropicais. Isto com ênfase às características ultraestruturais apresentadas, considerando que o *Prochilodus scrofa* e o *Astyanax scabripinnis* realizam fecundação externa, e, o *Phalloceros caudimaculatus* apresenta fecundação interna.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


Literatura

1- Estrutura testicular e características das células germinativas

Segundo a literatura especializada, alguns estudos morfológicos foram realizados no sentido de descrever a espermatogênese de diferentes espécies de peixes teleósteos. Dentre os trabalhos clássicos e pioneiros encontramos os estudos de TURNER (1919), GEISER (1922 e 1924), HANN (1927), VAUPEL (1929), JONES (1940), MENDONÇA (1943) e JAMES (1946). Entretanto, observamos que existe pouca clareza quanto à descrição sobre a organização estrutural dos testículos de peixes em geral. Alguns artigos indicam que a espermatogênese ocorre dentro de "lóbulos", enquanto que outros se referem a "túbulos". VLAMING (1974) e GURAYA (1976) não observaram diferenças entre os tipos "lobulares" e "tubulares" de testículos, e os termos lóbulos e túbulos foram usados indistintamente para a estrutura testicular por diferentes autores (HENDERSON, 1962; SANWAL & KHANNA, 1972; DALELA et al., 1976; LEATHERLAND & SONSTEGARD, 1978; ALEXANDRINO et al., 1985).

GRIER et al. (1980), estudando um grande número de espécies de teleósteos pertencentes às quatro ordens: Salmoniformes, Cipriniformes, Perciformes e Atheriniformes contribuíram com uma nova nomenclatura para o sistema reprodutor masculino de peixes ósseos. Segundo estes

unesp

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, sendo este tipo estrutural um pouco semelhante ao encontrado no testículo de mamíferos. Na ordem Atheriniformes o testículo é do tipo "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 espermatogenéticos delimitados por células de Sertoli (GRIER et al., 1980).

Nos Atheriniformes os cistos, que apresentam espermatogônias ou espermatócitos, se localizam geralmente na periferia testicular, enquanto que os cistos que possuem espermátides se localizam mais ao centro do testículo, próximo aos ductos eferentes. Este padrão testicular foi observado em peixes pertencentes às famílias *Poeciliidae*, *Goodeidae* e *Horaichthydae* (GRIER, 1981; FRAILE et al., 1992).

Posteriormente, GRIER (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 ainda não se chegou a um consenso sobre a estrutura testicular, principalmente em peixes.

Observamos também que não houve um padrão na descrição da morfologia testicular em peixes neotropicais, pois BARBIERI et al. (1981), LOPES et al. (1987), NAKAGHI (1996), ZAIDEN (1997) descrevem a presença de lóbulos seminíferos, enquanto que ANDRADE & GODINHO (1983), ANDRADE et al. (1985), CRUZ-LANDIM & CRUZ-HÖFLING (1986/1987), AGOSTINHO et al. (1987), ALEXANDRINO et al. (1987), AZEVEDO et al. (1988), SILVA & GODINHO (1991), MATOS et al. (1993), MATOS et al. (1993a), MATOS et al. (1995), GUSMÃO et al. (1999), ROMAGOSA et al.

unesp

(1999), ALVES DO AMARAL (1999) e VICENTINI et al. (2001), indicam a presença de túbulos seminíferos.

Segundo MATTEI et al. (1993) entretanto foram observados ainda, dois tipos de espermatogênese em peixes teleósteos. O primeiro tipo compreende a espermatogênese do 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.

Na espermatogênese semicística, os cistos germinativos se abrem antes do final da espermatogênese, a qual é completada no lúmen dos lóbulos. As pontes citoplasmáticas existentes entre as células germinativas se rompem, quando elas são liberadas dentro do lúmen dos lóbulos. Este processo ocorre nos mais diversos estágios da espermatogênese. Em *N. spinifer* e *Ophidion* sp. os cistos se rompem nos estágios iniciais da espermatogênese, enquanto que para vários indivíduos da família *Blenniidae*, os cistos se rompem em estágios mais avançados 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 lóbular, 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.

Quanto às características morfológicas das células germinativas, são escassos os estudos ultraestruturais nos períodos iniciais da espermatogênese de peixes em geral (CLEROT, 1976; GRIER, 1981; SELMAN & WALLACE, 1986; QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999). 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;

unesp

SRIVASTAVA, 1967). As espermatogônias podem se originar, ainda, a partir do estoque de células germinativas indiferenciadas primárias, situadas no espaço intertubular (RUBY & MC MILLAN, 1970; SHANBRAG & NADKARNI, 1979; ALEXANDRINO et al., 1985).

A renovação de espermatogônias em teleósteos, por outro lado, poderia ocorrer a partir de células germinativas primordiais com origem no interstício tubular, ou a partir de espermatogônias existentes na estrutura epitelial dos túbulos seminíferos (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 eletrondenso. O citoplasma contém mitocôndrias esféricas com poucas cristas, ribossomos livres, retículo endoplasmático 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 & CARVALHO, 1999; ZAIDEN, 2000).

As espermatogônias apresentam também uma estrutura eletrondensa no citoplasma denominada cimento intermitocondrial, o qual geralmente está associado a grupos de mitocôndrias (TOURY et al.,



1977; ANDRADE & GODINHO, 1983; SILVEIRA et al., 1990; ROMAGOSA et al., 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO & 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. Uma observação similar foi também encontrada em *Piaractus mesopotamicus* (ROMAGOSA et al., 1993).

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 & CARVALHO, 1999). Os espermatócitos secundários, que se originam a partir da primeira divisão meiótica dos espermatócitos primários, estão presentes nos cistos, porém são raramente observados (ROMAGOSA et al. 1999).

unesp

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 espermátides em espermatozóides (PLÖEN & COURTENS, 1986). Os cistos de espermátides, em diferentes estágios de maturação, ocorrem ao longo dos túbulos seminíferos. Esta distribuição foi ressaltada por vários autores em diferentes espécies de teleósteos (TURNER, 1919; BILARD, 1970; GRIER, 1975b; GRIER et al., 1980; NARAHARA, 1983; SILVA, 1987; GUSMÃO et al., 1999; ROMAGOSA et al., 1999).

BILLARD (1983), estudando o processo de espermiogênese da truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), observou quatro estágios espermatogenéticos. 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 eletrondensos. No quarto estágio a cromatina se apresentou com aspecto fibrilar. Entretanto, CRUZ-LANDIM & CRUZ-HÖFLING (1986/1987), descreveram para o tucunaré (*Cichla ocellaris*) o amadurecimento das espermátides em 5 estágios de maturação, onde, nos estágios finais, o núcleo sofre a alteração morfológica mais intensa, apresentando aspecto riniforme.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

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 assemelha ao núcleo dos espermatócitos secundários. No segundo estágio, o núcleo apresenta mudanças na forma, passando a exibir um aspecto de ferradura e cromatina bastante condensada. No terceiro estágio, o núcleo se assemelha a uma ponta de seta, com a cromatina ainda mais condensada, e passando para o quarto estágio, na fase de espermátide madura, adquire alongamento e condensação máxima de cromatina.

Embasado na literatura, existe ainda uma grande variação na organização morfológica dos espermatozóides em peixes, mostrando diferentes tipos. Isto comparando-se a fertilização interna e externa (BILLARD, 1986), assim como as características especiais na organização da peça intermediária (LAHNSTEINER et al., 1991).

Os espermatozóides de peixes apresentam grande diversidade de forma e estrutura (MATTEI, 1970). O estudo comparativo da morfologia dos espermatozóides de peixes teleósteos permitiu distinguirem-se três categorias de espermatozóides, de acordo com a sua forma e o seu grau de evolução (BILLARD, 1970). O primeiro tipo está constituído de espermatozóides como os da carpa, pouco elaborados, com cabeça

unesp

ovalada, mitocôndrias e citoplasma confinados na parte posterior da cabeça sem formarem peça intermediária verdadeira. O segundo tipo é constituído de espermatozóides, como os da truta, com cabeça ligeiramente alongada e peça intermediária na parte posterior da cabeça, formada por um colar de mitocôndrias, que às vezes se encontram fundidas. O terceiro tipo é o mais evoluído, representado pelos espermatozóides de lebistes. Sua cabeça é muito alongada, apresentando simetria bilateral. As mitocôndrias estão organizadas sob a forma de manguito na parte posterior da cabeça, constituindo a peça intermediária.

Os espermatozóides do primeiro e segundo tipos foram considerados como espermatozóides primitivos (BILLARD, 1970; GRIER, 1981; CRUZ-LANDIM & CRUZ-HÖFLING, 1986/1987; SILVA & GODINHO, 1991; MATOS et al., 1993; MATOS et al., 1993a). Entretanto, estudos de JAMIESON (1991) e MATTEI (1991), contradizem esta classificação, uma vez que os espermatozóides considerados primitivos estão presentes em grupos de peixes "superiores", enquanto que grupos "inferiores" apresentam espermatozóides estruturalmente considerados avançados. Os espermatozóides do terceiro tipo são os de peixes teleósteos vivíparos (BILLARD, 1970) e a modificação em sua morfologia está relacionada com o seu modo de fertilização interna (JONES & BUTLER, 1988).

unesp

A ausência de acrossoma é freqüente entre os peixes teleósteos, conforme os estudos apresentados por MATTEI (1970), ROMAGOSA (1991) e MATOS et al. (1993). Esta característica é justificada pela presença de micrópila nos óvulos de muitos peixes teleósteos (RICARDO et al., 1996), o que facilita a entrada dos espermatozóides nestas células. A presença de micrópila nos óvulos de teleósteos é a explicação mais aceita para a ausência de acrossoma, fato este ocorrido como uma adaptação, durante a evolução dos peixes (AFZELIUS, 1978).

Estudos realizados por SILVA & GODINHO (1991), em espermatozóides de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), demonstraram que a peça intermediária apresentou-se curta, fundida à cabeça e formada por um colar de mitocôndrias envolvendo a parte inicial do flagelo. Na região posterior da peça intermediária, evidenciaram-se expansões citoplasmáticas em forma de aletas, que circundam os 2/3 anteriores da cauda do espermatozóide. As expansões citoplasmáticas laterais da cauda, provavelmente aumentam a eficiência de seus batimentos (NICANDER, 1970; THIAW et al., 1986). Essas expansões podem variar em número dependendo da espécie (THIAW et al., 1986). Tais variações demonstram a grande diversidade de formas também presente na cauda de espermatozóides de peixes. Ainda, em relação a esta diversidade de forma, observa-se inclusive a presença de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

espermatozóides aflagelados, como se verifica em *Gymnarchus niloticus* (MATTEI et al., 1967).

Com relação à via espermática ou seminífera em peixes teleósteos, que apresentam em geral fecundação externa, os túbulos seminíferos abrem-se diretamente nos ductos testiculares principais, que se originam na parte cranial dos testículos (GRIER et al., 1980; LAHNSTEINER et al., 1994, VICENTINI et al., 2001). Em curimbatá (*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). Entretanto, em *Gambusia affinis*, que apresenta fecundação interna, os túbulos seminíferos se continuam pelos ductos eferentes. Estes ductos convergem para um canal testicular principal, onde os espermatozeugmatas, ou grupos de espermatozóides não encapsulados, se acumulam. O canal testicular se funde com o canal contralateral, na região posterior de ambos os testículos, e formam o ducto deferente que se dirige para o gonopódio (FRAILE et al., 1992).

2- *Características das células de Sertoli*

Em peixes, a terminologia utilizada para as células de Sertoli também não apresenta um padrão definido, pois estas foram denominadas de células do tecido conjuntivo em *Barbus luteus* (BHATTI & AL-DAHAM, 1978); de células foliculares em *Fundulus heteroclitus* (LOFTS et al., 1966) e de células limitantes por outros autores (ROBERTSON, 1958; HENDERSON, 1962; YARON, 1966; O' HALLORAN & IDLER, 1970; NICHOLLS & GRAHAM, 1972; GRIER, 1976).

Todavia, segundo GRIER et al. (1980), os únicos tipos celulares intratubulares, no testículo de teleósteos, são as células de Sertoli e as células germinativas. Externamente, as células limitantes circundam o túbulo seminífero para formar uma camada incompleta sobre sua superfície, e estas são separadas das células de Sertoli por intermédio da membrana basal. Na ausência de células limitantes, os vasos sanguíneos e as células de Leydig podem rodear diretamente a parede tubular.

CRUZ-HÖFLING & CRUZ-LANDIM (1984), descreveram no sardinhão (*Triportheus elongatus*) e no pacu (*Mylossoma aureum*), que as células de Sertoli revestem os cistos germinativos e estão localizadas

no interior do túbulo seminífero. Estas células variam em altura de acordo com o estágio de diferenciação do cisto germinativo. Cabe destacar ainda, segundo as autoras, que o contato entre as células de Sertoli é muito interdigitado e apresenta desmossomos e junções oclusivas. Pórem, o contato entre as células germinativas, no início da espermatogênese, e as células de Sertoli, não apresenta tais especializações de membrana.

Durante o processo de espermiogênese, as células de Sertoli se transformaram em células do epitélio de revestimento dos ductos eferentes em *Poeciliidae* (FRAILE et al., 1992), e *Goodeidae* (GRIER et al., 1978). Em *Fundulus grandis* (GRIER et al., 1980), as células de Sertoli tornam-se hipertróficas depois da espermiação e permanecem dentro do sistema de ductos eferentes. Em outros casos elas se degeneram após a espermiação (BILLARD, 1970), ou desaparecem durante a maturação final das espermátides (GRIER & LINTON, 1977).

unesp

3- Características do ciclo reprodutivo

Embora existam algumas espécies com ciclo reprodutivo contínuo, tais como *Salvelinus fontinalis* (HENDERSON, 1962), *Channa gachua* (SANWAL & KHANNA, 1972), *Ciprinus carpio* e *Carassius auratus* (BILLARD et al., 1982), e *Parasilurus aristotelis* (ILIADOU & FISHELSON, 1995), a grande maioria dos peixes teleósteos apresenta ciclo reprodutivo descontínuo, com um período caracterizado pela intensa proliferação de células germinativas e um outro período de quiescência, ou repouso testicular.

Segundo FRAILE et al. (1992), em *Gambusia affinis* foi observado um ciclo reprodutivo caracterizado por duas fases distintas: proliferação celular (março a novembro) e quiescência testicular (novembro a março), de acordo com as estações climáticas européias. Entretanto, em *Puntius duka*, JOSHI & JOSHI (1989) definiram os estágios de maturação, ativação, depleção e repouso testicular.

Considerando as variações sazonais na morfologia testicular, ANDRADE (1980) classificou o ciclo reprodutivo anual de *Leporinus silvestri* em quatro estágios: repouso, maturação, maduro e esgotado. ALEXANDRINO et al. (1985) utilizaram a mesma classificação para o

unesp

curimbatá (*Prochilodus scrofa*), sendo destacados em cada estágio ou fase testicular, os seguintes aspectos morfológicos dos túbulos ou lóbulos seminíferos:

a) *repouso*: os lóbulos apresentaram na sua parede apenas espermatogônias.

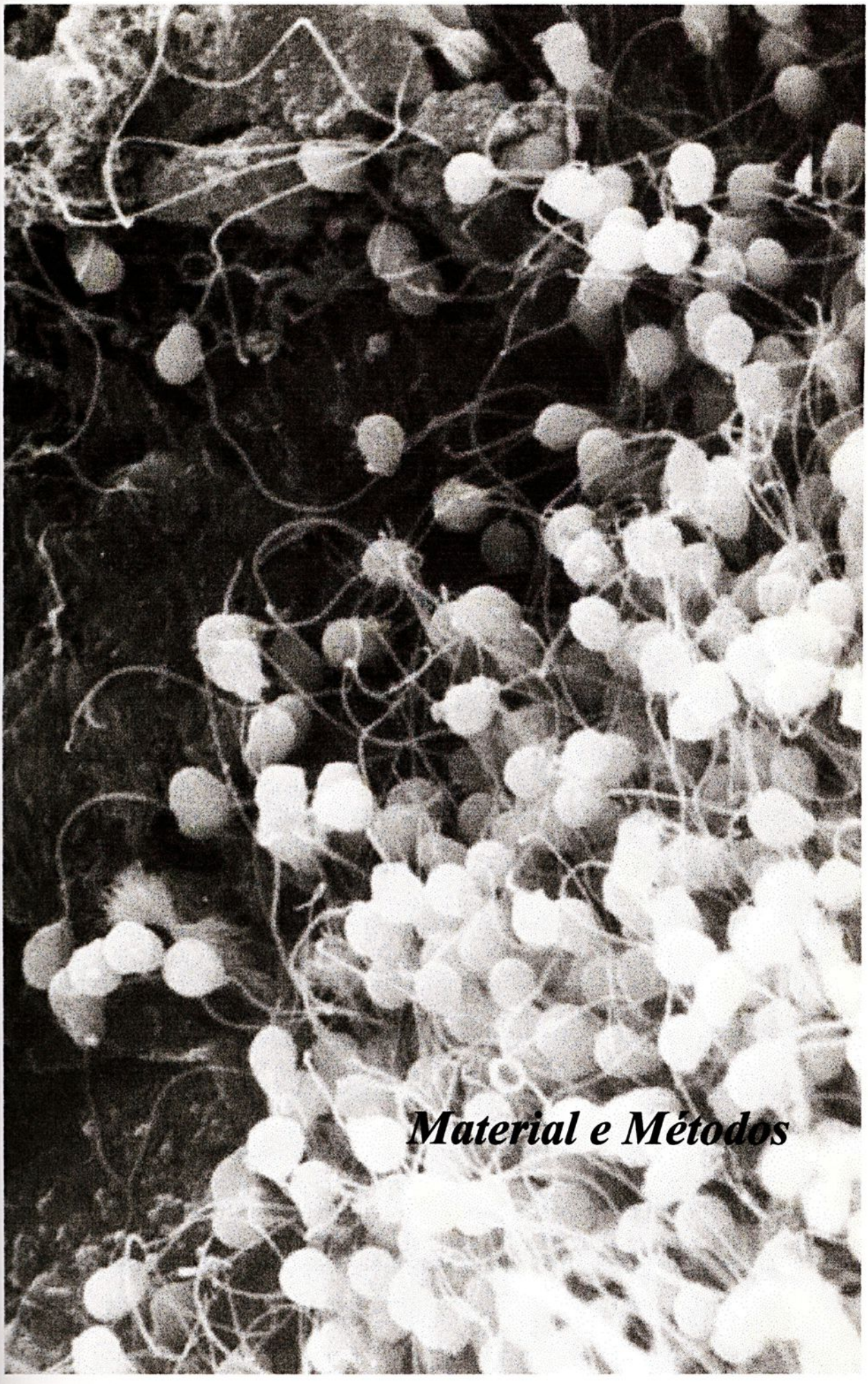
b) *maturação*: na periferia dos lóbulos foram observadas espermatogônias e, mais internamente, cistos principalmente de espermatócitos primários e, ocasionalmente, secundários e espermátides. Na fase adiantada de maturação, foram observados cistos de espermatozóides na parede tubular e espermatozóides livres no lúmen.

c) *maduro*: o lúmen dos lóbulos apresentou-se dilatado e preenchido quase totalmente por espermatozóides. Entretanto segundo os autores, algumas espermatogônias foram observadas nas paredes tubulares, considerando que os termos lóbulos ou túbulos foram adotados indistintamente.

unesp

d) *esgotado*: os lóbulos apresentaram diâmetro reduzido, com grande quantidade de espermatogônias na periferia e alguns cistos com poucas espermátides. Cistos de espermatócitos não foram observados, mas na luz de alguns túbulos, quantidades variáveis de espermatozóides foram encontradas.

Posteriormente, ALEXANDRINO et al. (1987), estudando o ciclo reprodutivo da truta arco-íris (*Salmo irideus*), mantidas em sistema de cultivo intensivo, caracterizaram três estágios intimamente associados: maturação, reprodução e esgotado. ROMAGOSA (1991), estudando o ciclo reprodutivo do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), em condições de confinamento, utilizou o termo regressão ao invés de esgotado, considerando que os animais utilizados em seu experimento não liberaram os gametas no meio externo. A mesma nomenclatura foi adotada por NAKAGHI (1996) e ZAIDEN (1997).



Material e Métodos

No presente trabalho foram utilizados exemplares machos e adultos de Curimbatá (*Prochilodus scrofa*), Lambari (*Astyanax scabripinnis*) e *Phalloceros caudimaculatus*, para estudos das características estruturais da espermatogênese. Os peixes foram coletados mensalmente em lotes de cinco exemplares, no período de março de 2000 a fevereiro de 2001, perfazendo um total de cento e oitenta animais, sendo sessenta de cada espécie. As coletas foram efetuadas por meio de redes de arrasto, com malhas diferenciadas, na bacia hidrográfica do Tiête, no município de Botucatu – SP.

Após coleta, os animais foram anestesiados com solução de benzocaína (1g de benzocaína/10 ml de álcool etílico/10 litros de água), para observação macroscópica e coleta adequada dos testículos, e posteriormente sacrificados. Os métodos para conservação e inclusão dos testículos estão de acordo com o preconizado por VAZZOLER (1996).

1- Análise macroscópica dos testículos

Os testículos foram fixados em formol a 10% para estudos macroscópicos posteriores. A fotodocumentação do material anatômico foi realizada com máquina fotográfica Pentax P30 (objetiva macro-zoom

28~80mm), ou com uso de estereomicroscópio Olympus do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu - UNESP.

2- Análise microscópica dos testículos

Os testículos foram fixados em formol a 10% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e/ou solução de Bouin, para inclusão em paraplast (Oxford Labware, USA). A rotina histológica foi desenvolvida no Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências do Câmpus de Bauru-UNESP.

A microtomia foi realizada em micrótomo convencional (American Optical, 820, USA), com espessuras de 3μm e 7μm, com emprego de navalhas descartáveis (Leica, 818, USA). Os cortes histológicos foram destinados para rotina de coloração em H/E e reação de Metacromasia pH 5,6 segundo MARTOJA & MARTOJA-PIERSON (1970). A análise e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX50 (Tokyo, Japan).

3- Análise ultraestrutural da espermatogênese

a) Microscopia eletrônica de transmissão

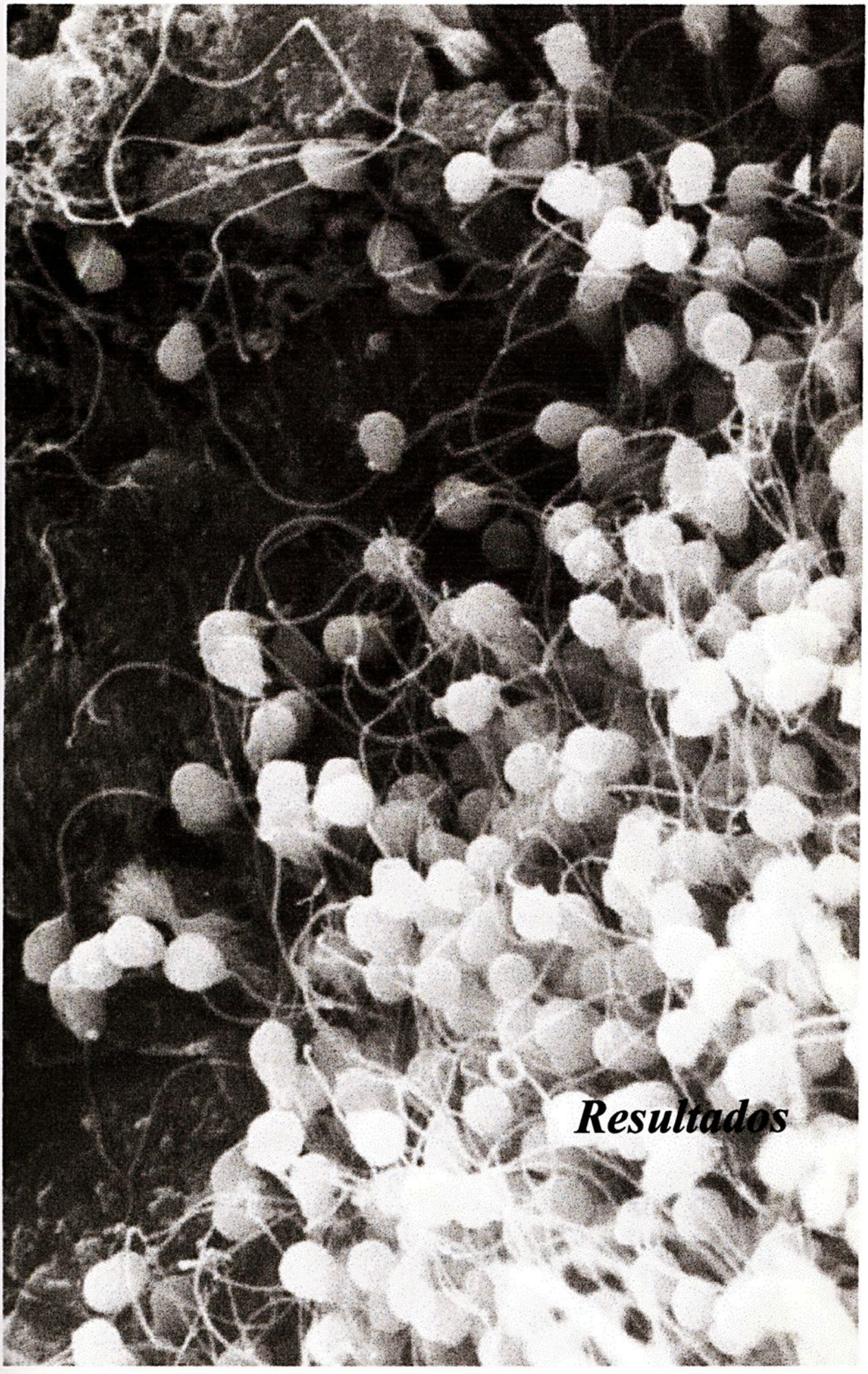
Fragmentos de tecidos testiculares foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) durante 4 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) por 3 horas. Após desidratação, o material foi incluído em araldite (Durcupan ACM, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e em seqüência, secções de 0,5 μm, foram coradas com azul de toluidina para escolha de campos. A seguir secções de 50 a 70 nm foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) para posterior análise e fotodocumentação em microscópios eletrônicos de transmissão Philips-EM301 e CM100 (Eindhoven, The Netherlands), com utilização de filmes preto e branco 35 mm Eastman 5302 (Kodak), junto ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu - UNESP.

b) Microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos de tecidos testiculares foram fixados por imersão em solução de Karnovsky modificada, contendo 2,5% de glutaraldeído, 2%

de paraformaldeído em solução tampão de fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,2. Em seguida pós-fixados em solução tamponada de tetróxido de ósmio a 1%, durante 2 horas. Após desidratação foi realizada a embebição dos tecidos em solução de acetato de isoamila, durante 3 horas. A secagem do material foi realizada obtendo-se o ponto crítico com dióxido de carbono líquido, em aparelho Balzers CPD-10 (Germany). As peças foram montadas em bases metálicas, para serem metalizadas com uma mistura coloidal de ouro-paládio em aparelho Balzers SCD-040 (Germany). O material foi analisado e documentado em microscópio eletrônico de varredura SEM 515 (Philips, Eindhoven, The Netherlands), com utilização de filme preto e branco 35 mm Technical Pan (Kodak), junto ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu - UNESP.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18



Resultados

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

1- Características macroscópicas dos testículos

Os testículos de *Prochilodus scrofa* (Fig. 1) e de *Astyanax scabripinnis* (Fig. 3), são órgãos pares, alongados, situados ventralmente à bexiga natatória. Variações na forma e principalmente na espessura testicular foram observadas durante o ciclo reprodutivo anual nestas duas espécies. Na fase de maturação testicular observamos que os testículos de *Astyanax scabripinnis* apresentam-se volumosos e principalmente tortuosos (Fig. 4), e com superfície irregular, devido às saliências provocadas pelo aumento de volume dos cistos germinativos (Figs. 5, 8 e 9).

Por outro lado, no *Prochilodus scrofa* a face visceral testicular apresenta-se lisa e com vasos sanguíneos superficiais aparentes (Fig. 1). Em ambas as espécies, os testículos estão individualizados na maior parte de sua extensão, e unidos apenas na extremidade caudal (Figs. 1 e 3), para formar o ducto espermático comum, que conflui à papila urogenital.

Os testículos de *Phalloceros caudimaculatus* (Figs. 2 e 7), são órgãos pares, apresentam forma ovóide, e encontram-se fusionados por toda a extensão da face medial. Na extremidade caudal destaca-se um

ducto deferente único (Fig. 6), que se dirige para o gonopódio, órgão copulador formado através de uma modificação da nadadeira anal. Nesta espécie não foram observadas variações na forma e volume testicular, no decorrer das estações do ano, conforme análises realizadas durante as coletas mensais.

2- Características microscópicas dos testículos

A análise histológica dos testículos das três espécies de peixes estudadas revelou que estas gônadas são revestidas por uma túnica conjuntiva, denominada de túnica albugínea que envia septos para o interior do parênquima testicular. Desta forma, no interior do testículo identificam-se dois compartimentos distintos, o seminífero e o intersticial. O compartimento seminífero é composto por cistos germinativos formados por células da linhagem espermatogênica, ou seja: espermatogônias primárias e secundárias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozóides, envolvidas por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli. O compartimento intersticial é constituído por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células intersticiais (Figs. 11, 56 e 57).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Em *Prochilodus scrofa* e *Astyanas scabripinnis*, observamos espermatogônias primárias distribuídas ao acaso, por toda a extensão dos túbulos seminíferos (Fig. 11), sendo característica de testículo espermatogonial irrestrito. Entretanto, em *Phalloceros caudimaculatus* a distribuição das espermatogônias primárias é restrita à porção distal dos túbulos seminíferos, configurando desta forma o padrão testicular espermatogonial restrito (Figs. 56 e 57).

A análise histológica realizada durante o período de doze meses de coleta, demonstrou que o ciclo reprodutivo anual de *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* está constituído por 4 estágios ou fases distintas: repouso (Fig. 10), maturação (Fig. 11), madura (Fig. 12) e esgotado (Fig. 13). Contudo, esta característica morfológica não foi observada em *Phalloceros caudimaculatus* que apresenta, durante todos os meses do ano, intensa proliferação celular (Figs. 55, 56 e 58). Mostra, portanto, diferentes cistos de células germinativas e grupos de espermatozóides denominados espermatozeugmatas, cujo significado morfofuncional é a presença de feixes de espermatozóides não encapsulados presentes na luz dos ductos eferentes (Figs. 55 e 58).

Em *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis*, durante a fase de repouso testicular, observada nos meses de baixa temperatura (maio,

unesp

junho e julho), os túbulos seminíferos estão constituídos apenas de espermatogônias primárias e células de Sertoli (Fig. 10). O interstício testicular apresenta-se desenvolvido, sendo caracterizado pelo tecido conjuntivo que, contem vasos sanguíneos e células intersticiais.

A seguir, com o aumento progressivo da temperatura (agosto, setembro e outubro), durante a fase de maturação testicular, observamos intensa proliferação celular, representada pela ocorrência de espermatogônias, células de Sertoli e pela formação de cistos germinativos de espermatócitos primários, espermátides e espermatozóides (Fig. 11).

Estas características morfológicas contribuem para um aumento do volume testicular, em ambas as espécies. Entretanto, em *Astyanax scabripinnis* destaca-se, conforme apresentado anteriormente, saliências provocadas pelo crescimento dos cistos germinativos (Figs. 8 e 9). Posteriormente, de novembro a fevereiro, observa-se a fase testicular madura, os túbulos seminíferos apresentam-se com lúmen dilatado contendo grande quantidade de espermatozóides (Fig. 12). Na etapa seguinte, as gônadas passam para a fase de testículo esgotado (de março a abril), apresentando túbulos seminíferos contendo espermatogônias primárias, células de Sertoli e espermatozóides residuais (Fig. 13).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

3- Características ultraestruturais da espermatogênese

A análise ultraestrutural dos testículos de *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis*, evidenciou a presença de espermatogônias primárias com núcleo volumoso, de formato redondo a ovalado, com cromatina granular distribuída de forma homogênea. O nucléolo é bastante desenvolvido, esférico e eletrondenso. No citoplasma observam-se várias mitocôndrias esféricas, com poucas cristas nas proximidades do envoltório nuclear. Entre os grupos de mitocôndrias foi observada uma estrutura eletrondensa, conhecida como cimento intermitocondrial, ou nuage (Figs. 14 e 26). Cada espermatogônia primária é circundada por expansões citoplasmáticas das células de Sertoli, que apresentam núcleo de formato irregular, com cromatina descompactada e algumas vezes nucléolo evidente (Fig. 14).

As espermatogônias primárias dividem-se por mitose, produzindo grupos de espermatogônias secundárias, que ficam confinadas no cisto germinativo produzido pelas expansões das células de Sertoli (Fig. 30). Dentro de cada cisto a maturação das células germinativas é sincrônica.

Em *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* as espermatogônias secundárias são similares às espermatogônias

primárias, porém de menor tamanho. Apresentam núcleo central, de formato redondo, com cromatina descompactada e um ou dois nucléolos excêntricos. As mitocôndrias são menos volumosas e densas, em comparação às encontradas nas espermatogônias primárias, e algumas vezes apresentam-se associadas a escassas nuages (Figs. 27, 28, 30 e 33).

Em *Phalloceros caudimaculatus*, observamos que as espermatogônias primárias e secundárias apresentam características ultraestruturais similares às encontradas para *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* (Fig. 38). Porém, estas células encontram-se restritas à porção distal dos túbulos seminíferos, conforme relatado anteriormente (Figs. 56 e 57).

Os espermatócitos primários, produzidos a partir da divisão mitótica das espermatogônias secundárias apresentam, nas três espécies estudadas, características similares. Estas células podem ser identificadas pelos estágios de meiose de seus núcleos.

O núcleo dos espermatócitos primários apresenta-se arredondado e com cromatina irregularmente condensada (Figs. 15, 29 e 39). Na prófase, durante o estágio de paquíteno, são encontrados os complexos sinaptonêmicos. Estes, formam-se a partir das regiões teloméricas dos

unesp

cromossomos ligados ao envoltório nuclear, e avançam para a região central do núcleo (Fig. 42). No citoplasma observam-se mitocôndrias arredondadas e alongadas, e ainda complexos de Golgi, localizados próximos a pontes citoplasmáticas (Figs. 39 e 42).

Os espermatócitos secundários (Figs. 16, 17 e 32), originados da primeira divisão da meiose, são células menores e com núcleo mais eletrondenso que os espermatócitos primários. Os espermatócitos secundários são células de difícil visualização, devido à curta duração deste estágio celular. Desta forma é comum encontrarmos cistos germinativos apresentando espermatócitos primários em divisão, juntamente com alguns espermatócitos secundários presentes (Figs. 16 e 32).

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 espermátides maduras, com alterações nucleares e citoplasmáticas. A análise ultraestrutural do processo de espermiogênese revelou diferenças significativas entre as três espécies de peixes teleósteos estudadas.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Em *Prochilodus scrofa*, durante o processo de espermiogênese, observa-se nas espermátides, compactação gradual da cromatina contudo sem haver alongamento do núcleo (Figs. 18, 19, 20 e 21). A fossa nuclear das espermátides apresenta-se relativamente bem desenvolvida, e os centríolos proximal e distal são evidentes (Fig. 18). O centríolo distal, diferenciado em corpúsculo basal, dá origem ao flagelo, que se alonga e apresenta-se constituído por axonema clássico do tipo 9 + 2, com nove duplas periféricas de microtúbulos e um par central (Fig. 25).

Os espermatozóides de *Prochilodus scrofa* apresentam-se constituídos por três regiões distintas: cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça dos espermatozóides é arredondada e não apresenta vesícula acrossomal. O núcleo contém grumos de cromatina muito condensada e uma reentrância basal, ou fossa nuclear, que abriga o complexo centriolar e o início do flagelo (Figs. 22, 23 e 24). A peça intermediária é relativamente curta e contém um pequeno número de mitocôndrias (Fig. 23). Na região posterior da peça intermediária, evidenciam-se projeções citoplasmáticas que envolvem parcialmente o flagelo, formando assim um canal citoplasmático entre o flagelo e a membrana citoplasmática do espermatozóide (Fig. 23).

unesp

Em *Astyanax scabripinnis*, durante o processo de espermiogênese, as características ultraestruturais das espermátides demonstraram uma rápida compactação ou condensação da cromatina (Figs. 31 e 34). Este processo de compactação ocorre uniformemente com grânulos homogeneamente distribuídos, sendo ocasionalmente observados agrupamentos pequenos e esparsos de cromatina (Fig. 34). As mitocôndrias apresentam-se geralmente esféricas e agrupadas próximas à fossa nuclear na região dos centríolos (Fig. 31). O citoplasma da espermátide desloca-se no sentido do flagelo, formando a bainha citoplasmática e originando o canal citoplasmático, separando as mitocôndrias do flagelo e dando origem à peça intermediária (Fig. 34).

Os espermatozóides de *Astyanax scabripinnis* apresentam-se também constituídos por cabeça, peça intermediária curta e cauda (Figs. 35, 36 e 37). A cabeça arredondada é formada pelo núcleo, de elevada densidade eletrônica e não contém vesícula acrossomal. Na fossa nuclear localizam-se dois centríolos: o proximal dentro da depressão, e o distal que dá origem ao flagelo, que se apresenta constituído de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. A cauda é constituída essencialmente pelo flagelo, envolvido em sua região inicial pela bainha citoplasmática (Figs. 35 e 37).

unesp

Em *Phalloceros caudimaculatus*, durante o processo de espermiogênese, observa-se nas espermátides compactação ou condensação gradual da cromatina, que se inicia na periferia e se continua para a região central do núcleo. Paralelamente a este processo, observamos que o núcleo altera a sua forma, estando no início do processo de espermiogênese com aspecto arredondado (Figs. 43, 44 e 45), e ao final deste processo, assume a forma alongada. Entretanto, também nesta espécie, não se observou a formação de um acrossoma (Figs. 47, 48, 49, 50 e 51).

As espermátides jovens apresentam núcleo arredondado, com cromatina distribuída de forma heterogênea e ainda alguns grumos esparsamente distribuídos (Figs. 43 e 44). No citoplasma observamos mitocôndrias arredondadas, dispostas de forma aleatória. Na seqüência do processo de espermiogênese, o citoplasma inicia migração em direção ao pólo da célula que apresenta o início da formação do flagelo (Fig. 43). Como conseqüência deste movimento, as mitocôndrias arranjam-se ao longo do flagelo recém-formado (Figs. 44 e 45). Neste momento, o flagelo se encontra lateralmente ao núcleo (Fig. 45), que já se apresenta com cromatina homogênea.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A seguir, se inicia a formação da fossa nuclear que se aprofunda em direção ao centro do núcleo, dando início ao alongamento nuclear em torno do complexo centriolar, constituído pelos centríolos proximal e distal (Figs. 46, 47 e 48). Observamos então, o início da condensação da cromatina periférica, que se continua em direção ao centro do núcleo (Figs. 47, 48 e 49). Esta condensação dá inicialmente à cabeça da espermátide aspecto de ferradura (Fig. 49), e ao final do processo aspecto de lança ou ponta de flecha (Fig. 51). O flagelo apresenta-se constituído, também nesta espécie, pelo axonema do tipo 9+2 (Fig. 49).

No início da maturação das espermátides, estas células se encontram dispersas de maneira aleatória dentro do cisto germinativo (Fig. 57). Com o decorrer do processo de espermiogênese, após a fase de condensação da cromatina e alongamento do núcleo das espermátides maduras, estas células migram em direção à periferia do cisto germinativo (Fig. 53). Arranjam-se lateralmente, em paliçada, orientando as cabeças em direção ao citoplasma das células de Sertoli e mantendo os flagelos direcionados para o centro do cisto (Fig. 52 e 54). Este arranjo forma um anel periférico eletrondenso que também pode ser visualizado em microscopia óptica (Figs. 55 e 56), correspondendo a uma zona escura na periferia do cisto germinativo.

unesp

Quanto às características ultraestruturais das células de Sertoli, nas três espécies de peixes estudadas, observamos que estas formam a parede do cisto germinativo, que contém células da linhagem germinativa, geralmente numa mesma fase de desenvolvimento (Figs. 15, 29, 39 e 52). O núcleo apresenta forma irregular, podendo ser alongado ou triangular, com cromatina dispersa e nucléolo por vezes evidente. O citoplasma é escasso, apresenta mitocôndrias redondas ou alongadas e retículo endoplasmático liso abundante (Figs. 14, 15, 27, 39 e 53).

Algumas vezes pôde-se observar que o cisto germinativo está constituído por duas células de Sertoli (Figs. 29 e 52). Estas células apresentam algumas especializações de membranas relacionadas à manutenção da integridade da parede do cisto germinativo. O contato entre células de Sertoli é altamente interdigitado, com presença de desmossomos e junções oclusivas (Figs. 40 e 41).

No final do processo de espermiogênese, após a formação dos espermatozóides, ocorre o rompimento da parede dos cistos germinativos e conseqüente extravasamento do conteúdo no lúmen dos túbulos seminíferos. Assim, se caracteriza nas três espécies estudadas a espermatogênese do tipo cística.

unesp

Em *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* não observamos associação direta entre as células germinativas maduras e o citoplasma das células de Sertoli, estando portanto estas células dispostas de forma aleatória dentro do cisto. Após o rompimento dos cistos, os espermatozóides ganham a luz dos túbulos seminíferos (Figs. 22, 28 e 30), e se orientam para o ducto testicular principal, e deste para o ducto espermático, considerando que ambas as espécies apresentam fecundação externa.

Em *Phalloceros caudimaculatus*, conforme destacado anteriormente, existe associação das espermátides maduras ou espermatozóides, com as células de Sertoli (Figs. 41, 53 e 54). Após o rompimento do cisto, os grupos de espermatozóides, denominados espermatozeugmatas, ganham a luz tubular e dirigem-se aos ductos eferentes (Fig. 58). Os ductos eferentes são observados intratesticularmente e convergem para formar um ducto deferente único (Fig. 6). Este se dirige para o gonopódio, uma vez que esta espécie apresenta fecundação interna.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Fig.1. Vista ventral da cavidade corpórea de *Prochilodus scrofa*, com destaque para testículos (t) em fase de maturação, (0,7 X).

Fig.2. Testículos (asteriscos) fusionados (seta) de *Phalloceros caudimaculatus*, em vista ventral (50X).

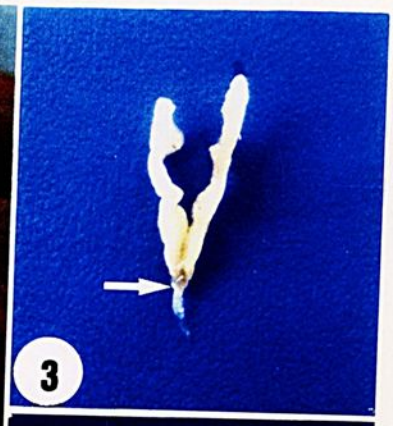
Fig.3. Testículos de *Astyanax scabripinnis* em vista ventral, com indicação de união testicular na extremidade caudal (seta), (3X).

Fig.4. Vista lateral dos testículos de *Astyanax scabripinnis*, em fase de maturação, destacando a presença de reentrâncias (setas), (3X).

Fig.5. Detalhe da superfície testicular de *Astyanax scabripinnis* (40X).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


t
t
1


3


4


*
*
2


5

Fig.6. Microscopia eletrônica de varredura dos testículos (asteriscos) de *Phalloceros caudimaculatus*, com indicação da área de união testicular (seta) e início do ducto deferente (d), (40X).

Fig.7. Detalhe da união testicular (seta) de *Phalloceros caudimaculatus* (105X).

Fig.8. Microscopia eletrônica de varredura da superfície testicular de *Astyanax scabripinnis*, apresentando relevo irregular, formado pelos cistos germinativos (asterisco), (95X).

Fig.9. Detalhe da superfície testicular de *Astyanax scabripinnis*, (530X).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


d
6


8


7

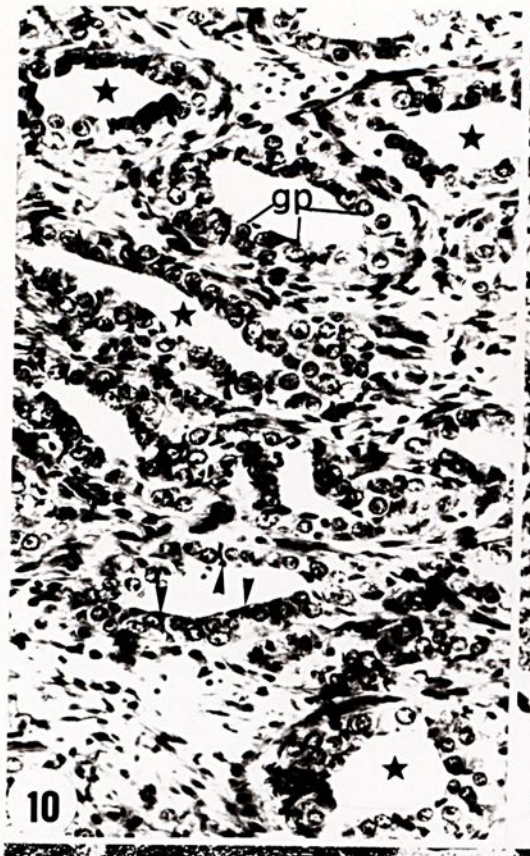

9

Fig.10. Microscopia óptica do testículo espermatogonial irrestrito de *Prochilodus scrofa* na fase de repouso, apresentando luz tubular vazia (estrelas) e tecido germinativo com espermatogônias primárias (gp) e células de Sertoli (cabeças de setas), (H/E, 200X).

Fig.11. Testículo espermatogonial irrestrito de *Prochilodus scrofa* na fase de maturação, apresentando espermatogônias primárias distribuídas ao longo dos túbulos seminíferos (cabeças de setas), grupos de espermatogônias primárias (gp), cistos de espermatócitos primários (cp) e espermátides (ep), e espermatozóides livres na luz tubular (z), (H/E, 200X).

Fig.12. Testículo de *Prochilodus scrofa* na fase madura destacando túnica albugínea espessa (setas) e espermatozóides livres na luz tubular (z), (H/E, 40X).

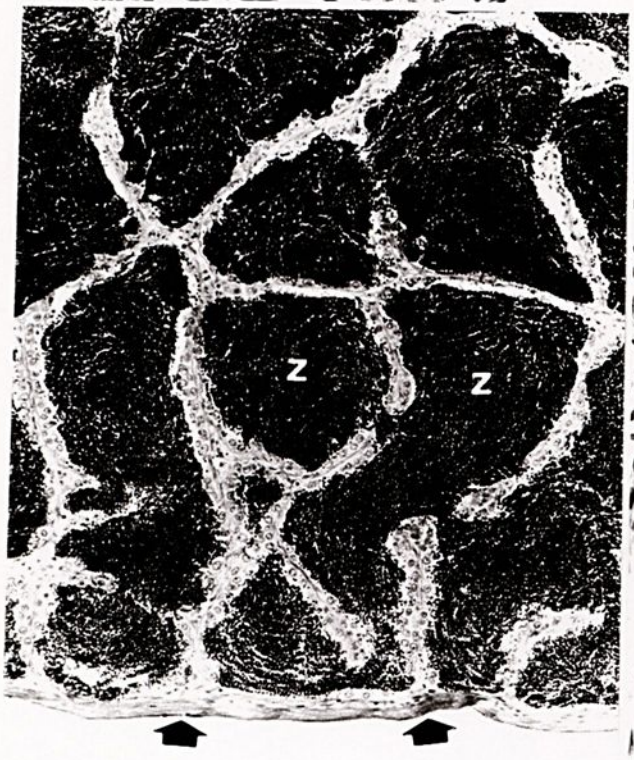
Fig.13. Testículo de *Prochilodus scrofa* na fase esgotada, apresentando luz tubular com espermatozóides residuais (z) e tecido germinativo com espermatogônias primárias (gp) e células de Sertoli (cabeças de setas), (H/E, 200X).



10



11



12

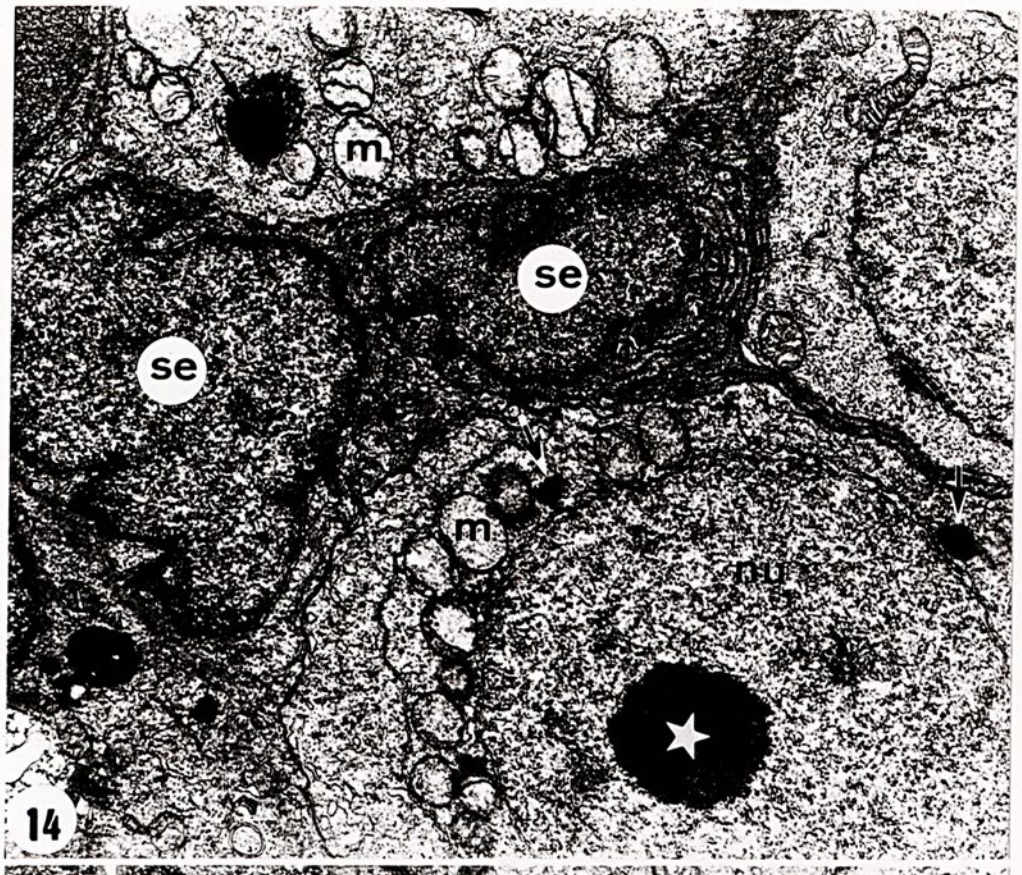


13

Fig.14. Microscopia eletrônica de transmissão de testículo de *Prochilodus scrofa*, apresentando células de Sertoli (se), associadas à espermatogônia primária exibindo: núcleo (nu) com nucléolo evidente (estrela), e citoplasma com "nuages" (setas) associadas às mitocôndrias (m), (13.000X).

Fig.15. Cisto de espermatócitos primários (cp) de *Prochilodus scrofa* limitado por célula de Sertoli (se), (13.000X).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18



14



15

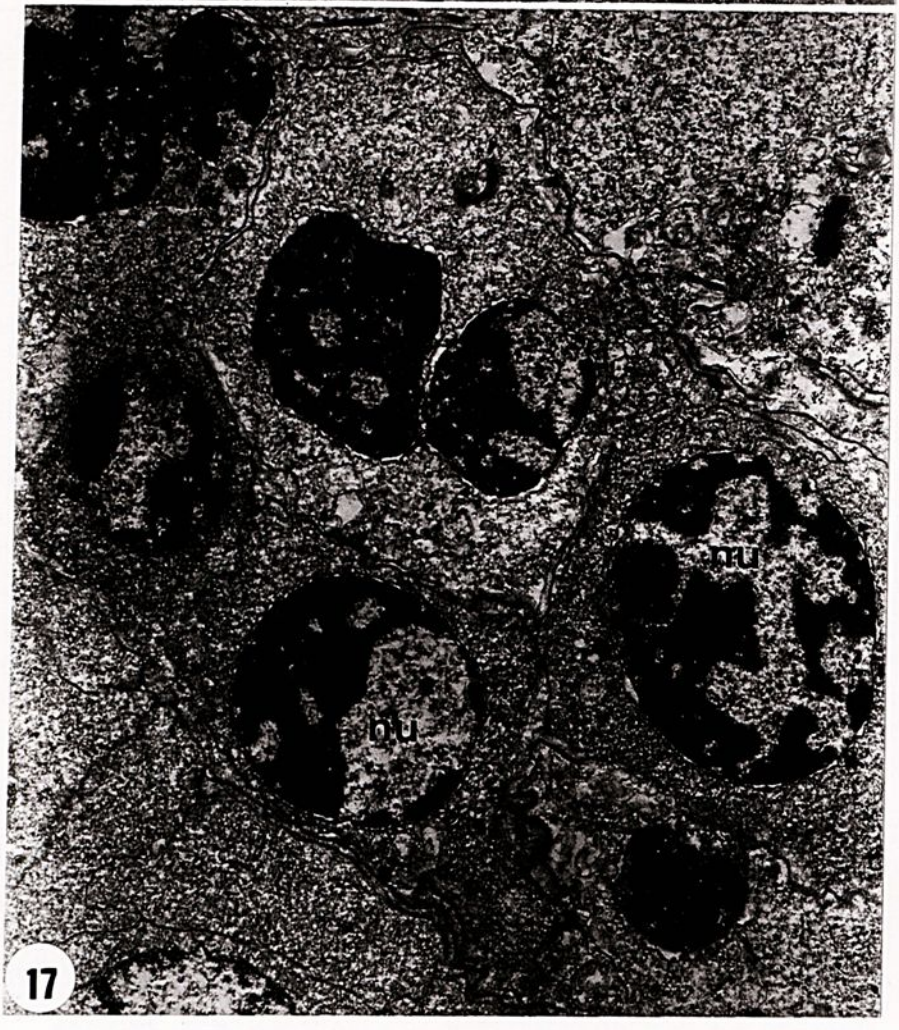
Fig.16. Vista panorâmica do testículo de *Prochilodus scrofa*, com destaque para tecido intersticial (it) e célula de Sertoli (se) limitando cisto contendo espermatócitos primários (cp) e espermatócitos secundários (cs), (3.600X).

Fig.17. Detalhe de cisto de espermatócitos secundários, com destaque para núcleo (nu) com áreas de cromatina irregularmente compactada, (10.000X).

unesp



16

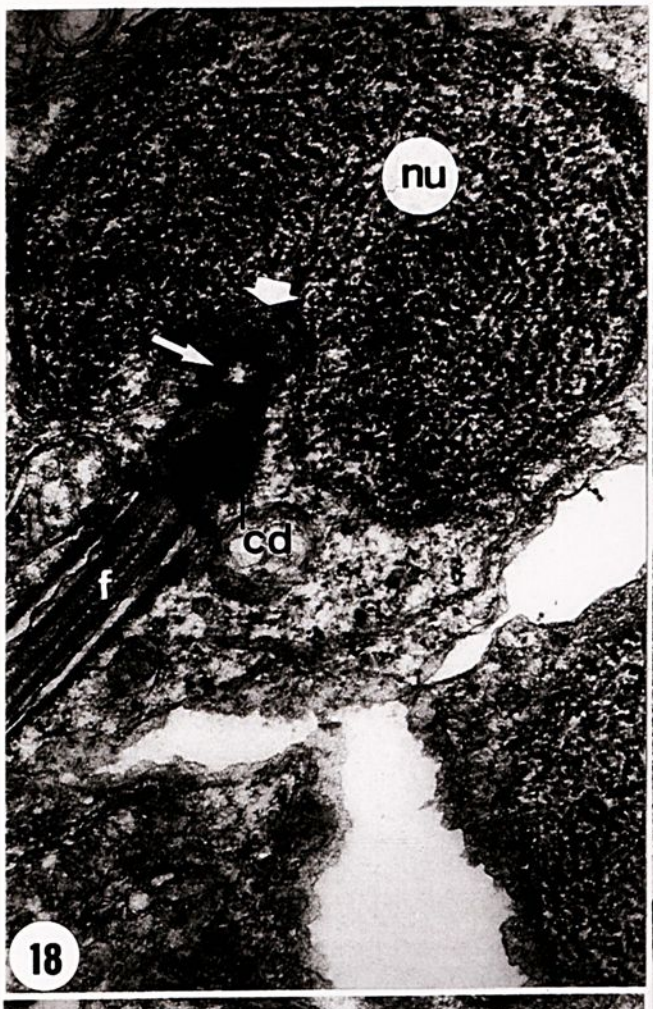


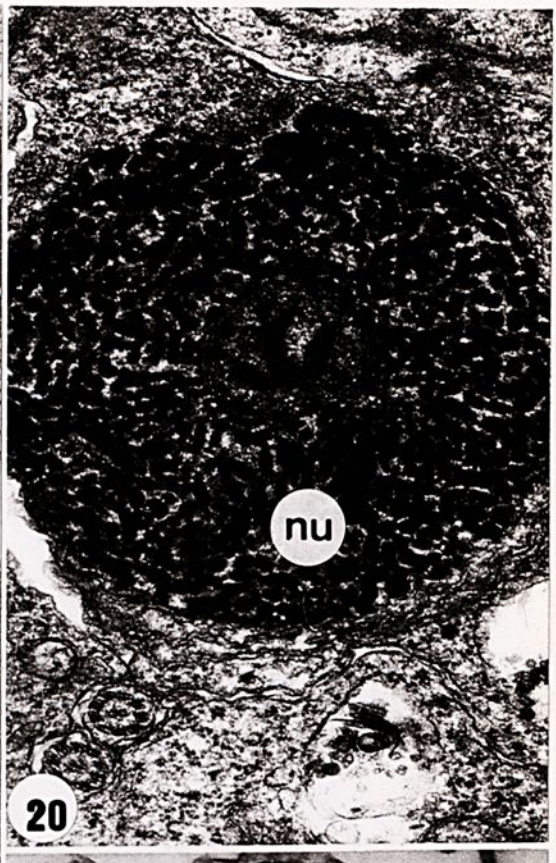
17

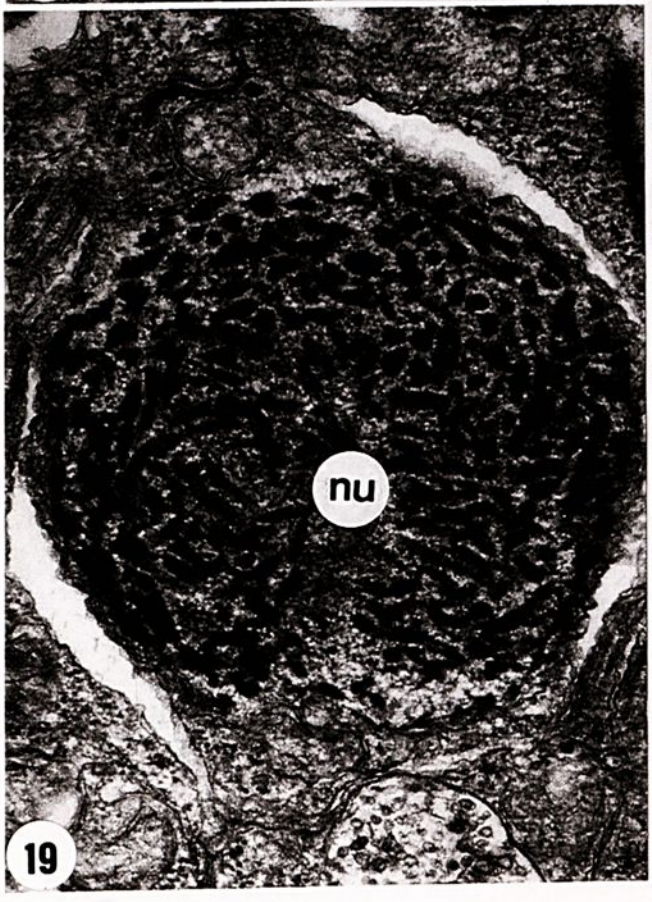
Fig.18. Espermátide jovem de *Prochilodus scrofa* apresentando núcleo (nu) com cromatina irregularmente compactada. Observar fossa nuclear (seta espessa), centríolo proximal (seta fina), centríolo distal (cd) e flagelo (f), (36.000X).

Figs.19, 20 e 21. Espermátides de *Prochilodus scrofa* apresentando núcleo (nu) com diferentes fases de compactação da cromatina, durante o processo de espermiogênese, (em 19 e 20:36.000X, em 21:41.000X).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


nu
cd
f
18


nu
20


nu
19

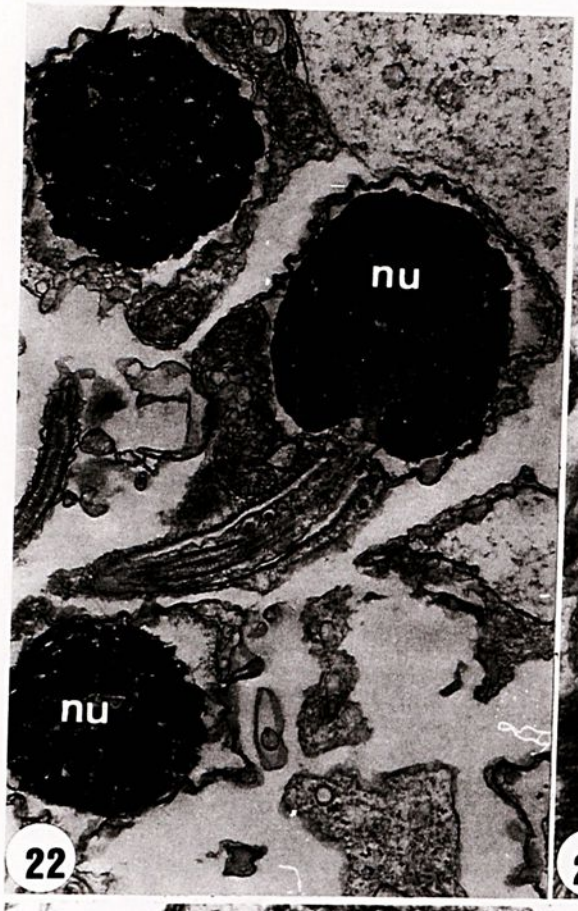

nu
21

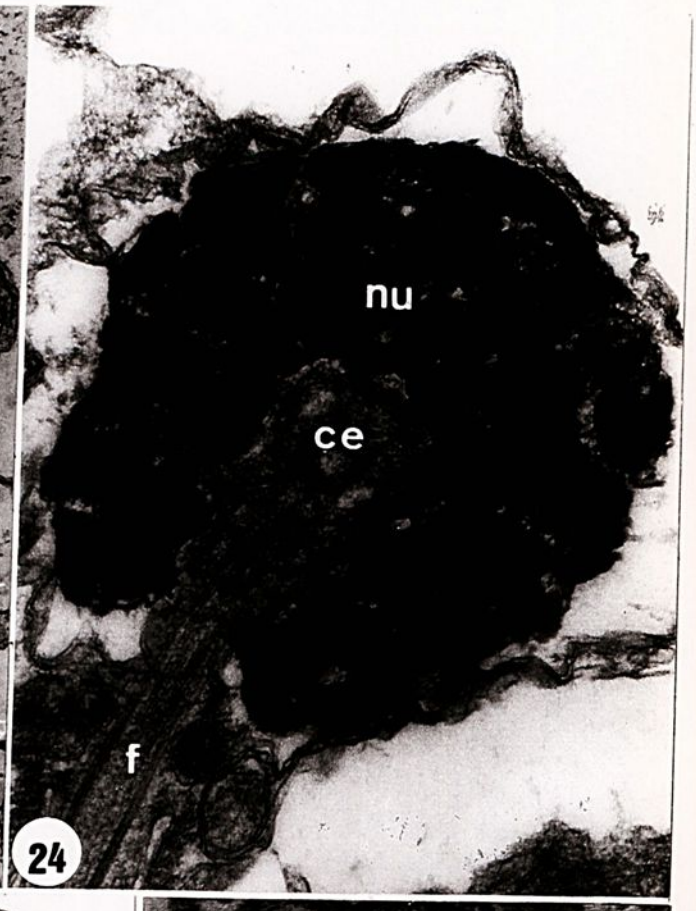
Fig.22. Espermatozóides de *Prochilodus scrofa* livres na luz tubular seminífera, apresentando cabeça arredondada, com núcleo (nu) formado por grumos de cromatina altamente condensada, (21.000X).

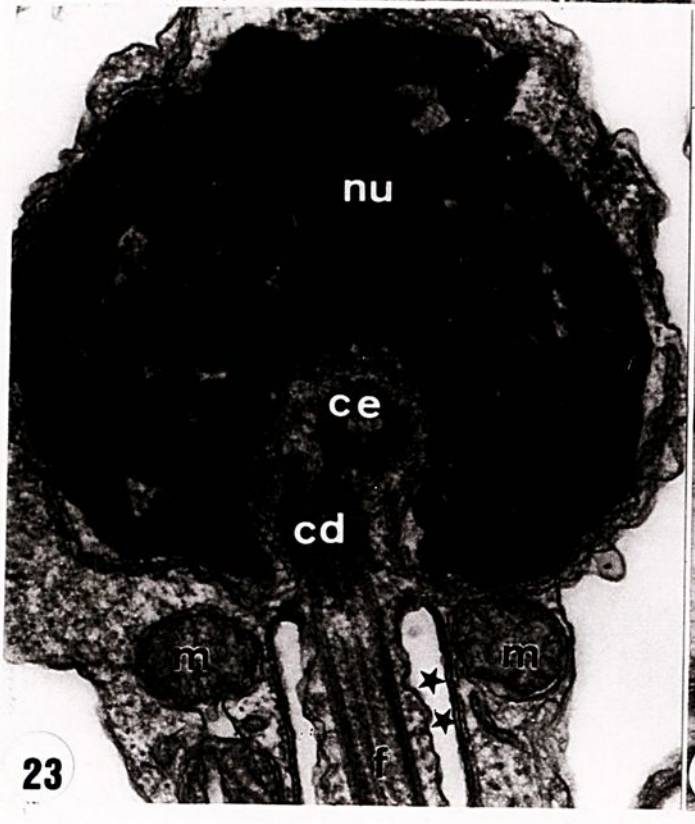
Figs.23 e 24. Detalhes de espermatozóides de *Prochilodus scrofa* apresentando núcleo (nu) com grumos de cromatina altamente condensada, centríolo proximal (ce), centríolo distal (cd), mitocôndrias (m) na peça intermediária, flagelo (f) e canal citoplasmático (estrelas), (52.500X).

Fig.25. Detalhe de axonema apresentando configuração clássica 9+2, (165.000X).

unesp


nu
nu
22


nu
ce
f
24


nu
ce
cd
m
m
f
23


9
7
6
5
4
25

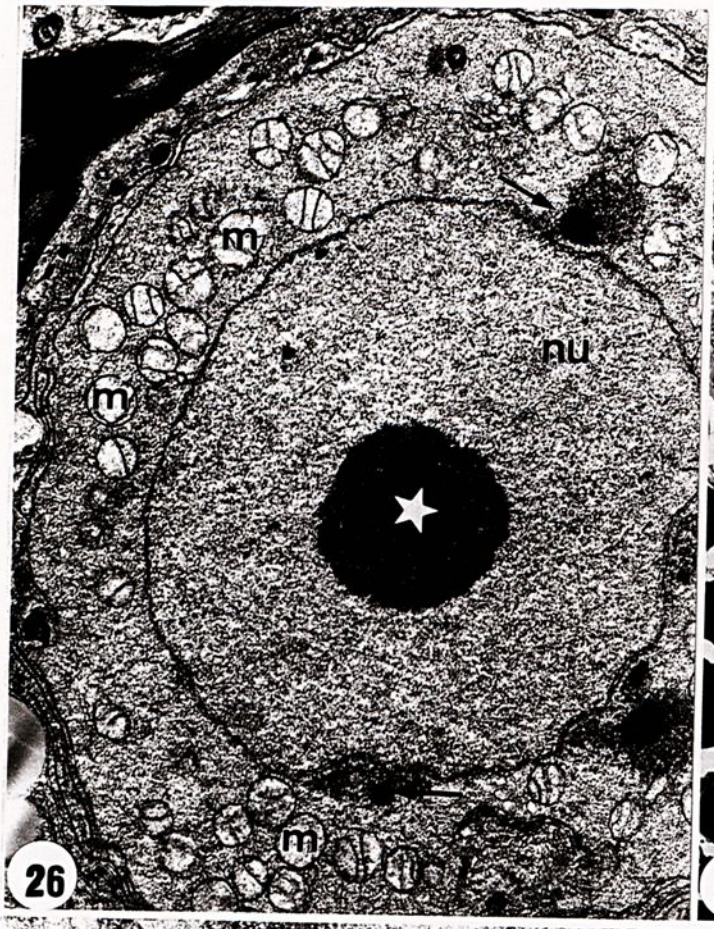
Fig.26. Microscopia eletrônica de transmissão de testículo espermatogonial irrestrito de *Astyanax scabripinnis* apresentando espermatogônia com núcleo (nu) e nucléolo evidente (estrela), e citoplasma com "nuages" (setas) associadas às mitocôndrias (m), (13.000X).

Fig.27. Célula de Sertoli (se) de *Astyanax scabripinnis* limitando cisto de espermatogônia secundária (gs), (13.000X).

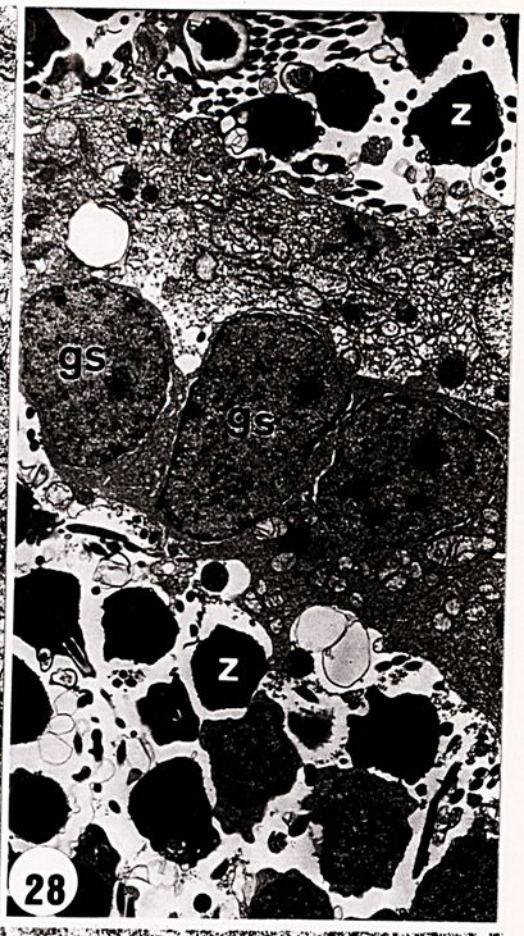
Fig.28. Testículo de *Astyanax scabripinnis* na fase madura exibindo espermatozóides (z) livres na luz tubular e tecido germinativo com espermatogônias secundárias (gs), (6.500X).

Fig.29. Cisto de espermatócitos primários (cp), limitados por células de Sertoli (se), (13.000X).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18



26



28



27



29

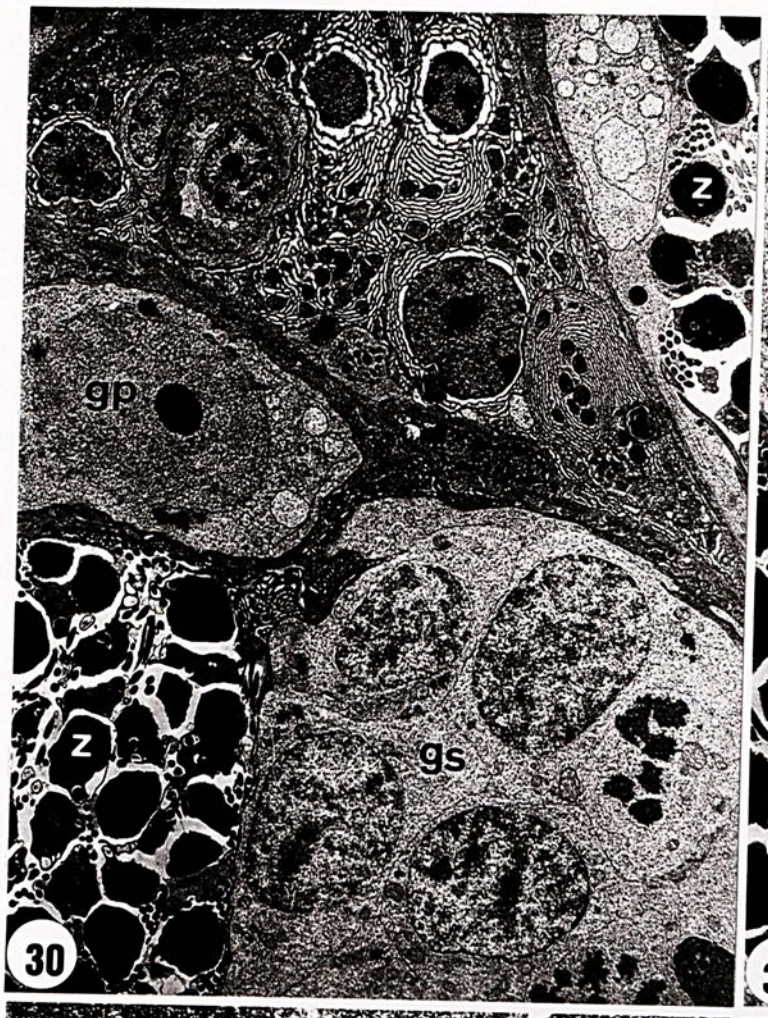
Fig.30. Vista panorâmica do testículo de *Astyanax scabripinnis*, apresentando espermatogônia primária (gp), cisto de espermatogônias secundárias (gs) e espermatozóides (z) livres na luz tubular, (5.000X)

Fig.31. Cisto de espermátides jovens apresentando núcleo arredondado (nu), mitocôndrias (m) e flagelo (seta) em corte transversal, (16.500X).

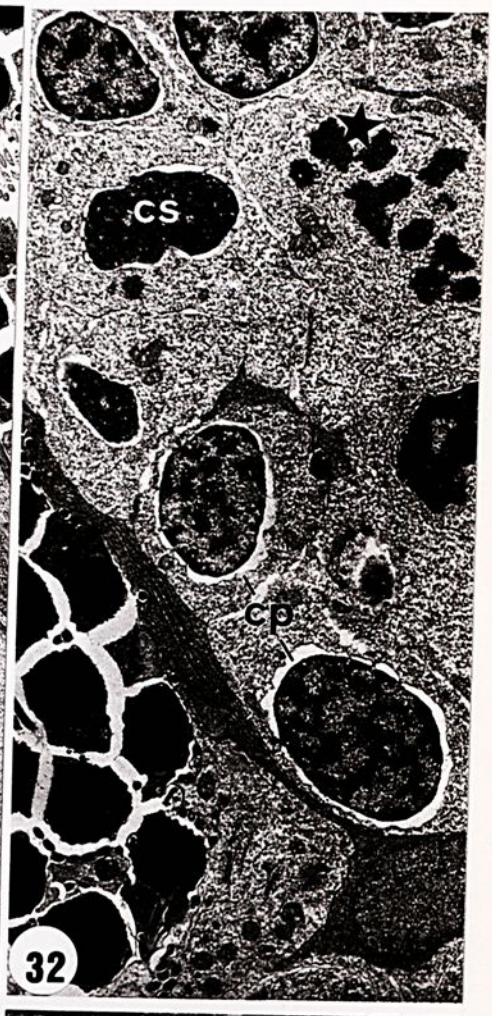
Fig.32. Cisto germinativo de espermatócitos primários (cp), espermatócito primário em divisão (estrela) e espermatócito secundário (cs), (6.500X).

Fig.33. Cisto de espermatogônias secundárias (gs), com nucléolo evidente, (8.000X).

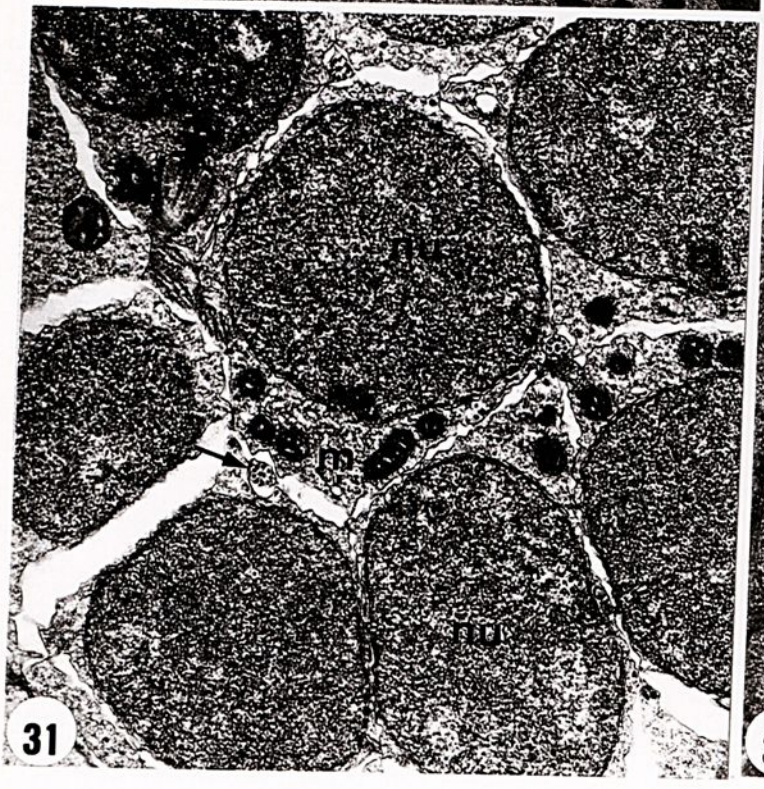
cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18



30



32



31

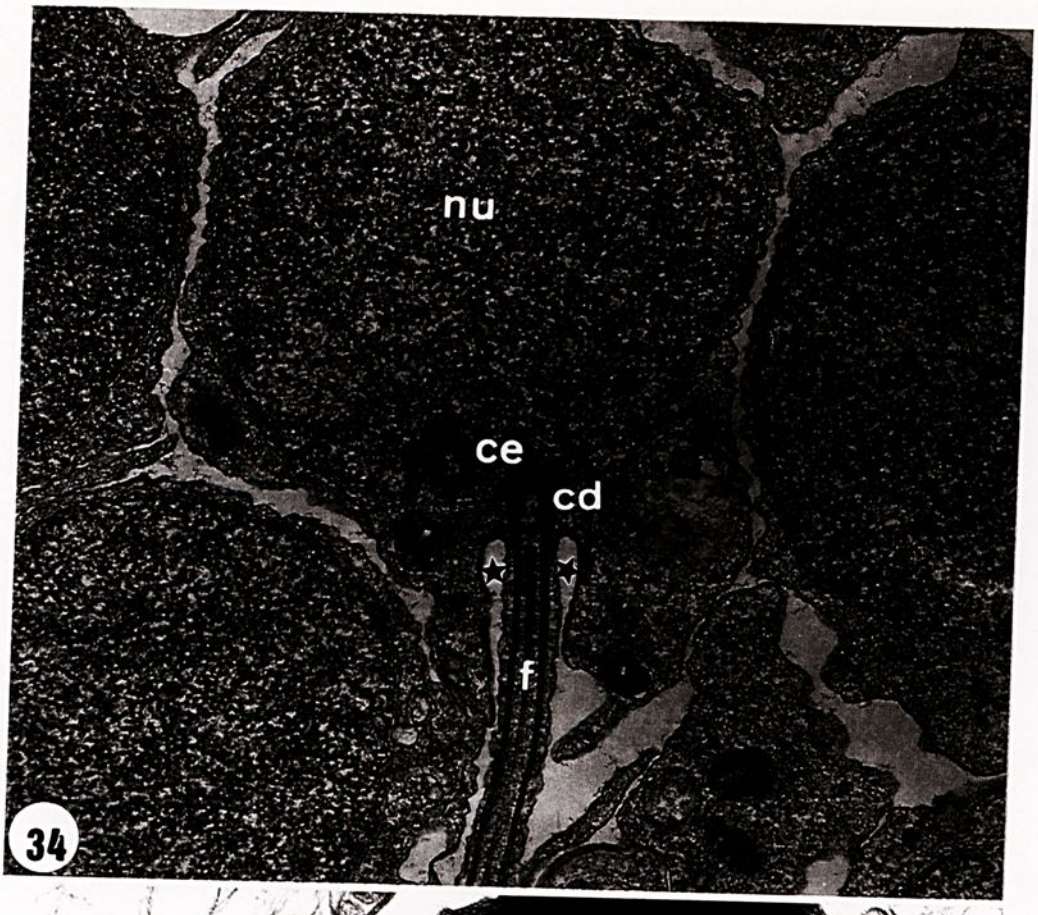


33

Fig.34. Espermátides de *Astyanax scabripinnis*, apresentando núcleo (nu) com cromatina em fase de compactação. Destaque para centríolo proximal (ce), centríolo distal (cd), canal citoplasmático (estrelas) e flagelo (f), (27.500X).

Fig.35. Espermatozóide de *Astyanax scabripinnis* livre na luz tubular apresentando núcleo (nu) com cromatina homogênea altamente condensada, fossa nuclear (asterisco) e flagelo (f), (36.000X).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

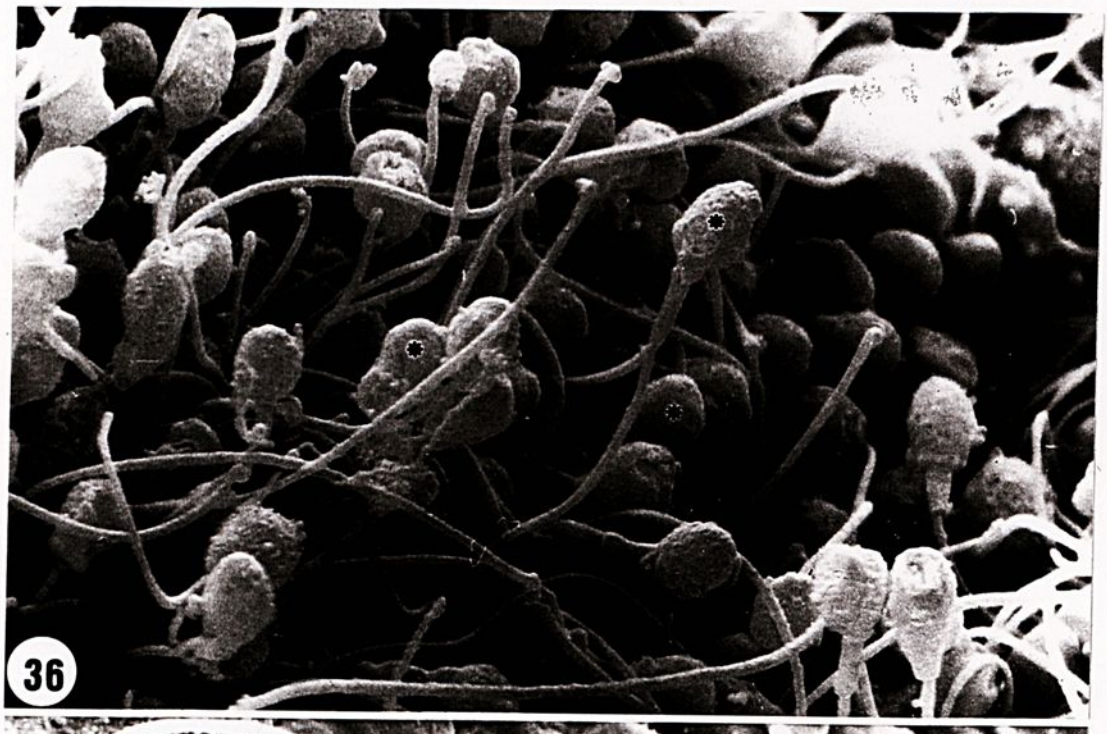

nu
ce
cd
f
34


nu
f
35

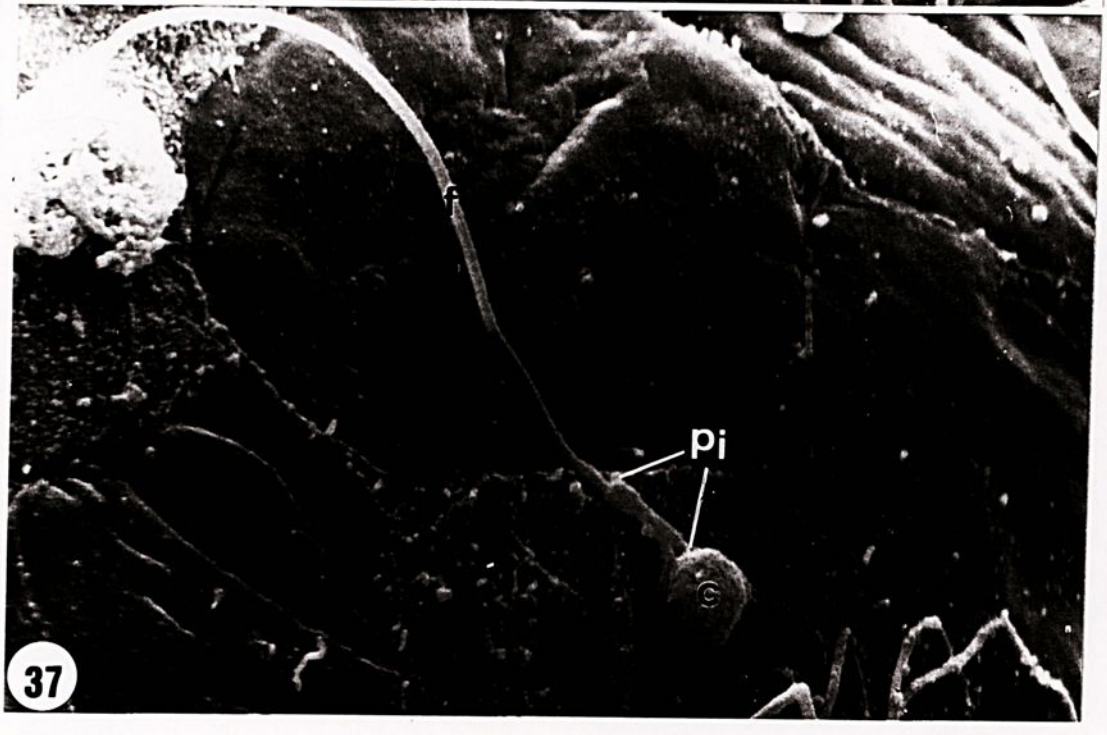
Fig.36. Microscopia eletrônica de varredura de espermatozóides de *Astyanax scabripinnis* evidenciando as cabeças arredondadas (asteriscos), (5.300X).

Fig.37. Detalhe do espermatozóide de *Astyanax scabripinnis* apresentando cabeça arredondada (c), peça intermediária (pi) e flagelo (f), (5.700X).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18



36



37

Fig.38. Microscopia eletrônica de transmissão de testículo espermatogonial restrito de *Phalloceros caudimaculatus*, apresentando cisto de espermatogônias secundárias (gs) limitado por célula de Sertoli (se), (10.000X).

Fig.39. Detalhe de cisto germinativo evidenciando célula de Sertoli (se) e espermatócito primário (cp) apresentando mitocôndrias (m), (16.500X).

Fig.40. Detalhe da união de duas células de Sertoli por desmossomas (cabeças de setas), (50.000X).

Fig.41. União entre células de Sertoli (se) por desmossomas (cabeças de setas), apresentando associação com núcleos de espermátides maduras (estrelas), (50.000X).



38



40



39



41

Fig.42. Núcleo de espermatócito primário (nu) de *Phalloceros caudimaculatus* apresentando membrana nuclear com poros (setas) e complexo sinaptonêmico (cabeças de setas). Destaque no citoplasma para complexo de Golgi (go) e mitocôndrias (m), (21.000X).

Figs.43, 44 e 45. Características ultraestruturais de espermátides jovens de *Phalloceros caudimaculatus* apresentando núcleo (nu) em diferentes fases de condensação da cromatina, mitocôndrias (m) e flagelo (f), (em 43:27.500X; em 44:16.500X; em 45:21.000X).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18



42



44



43

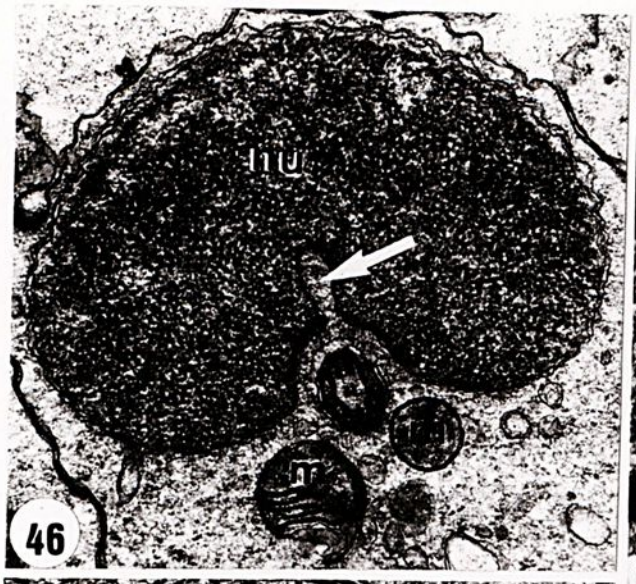


45

Fig.46. Espermátide de *Phalloceros caudimaculatus* apresentando núcleo (nu) com cromatina descompactada, fossa nuclear (seta) e mitocôndrias (m), (27.500X).

Figs. 47 e 48. Espermátides com núcleo em fase inicial de condensação periférica da cromatina (asteriscos) no início do processo de espermiogênese. São destacados centríolo proximal (ce), centríolo distal (cd), flagelo (f) e fossa nuclear (seta), (em 47:50.000X; em 48:36.000X).

Figs. 49 e 50. Espermátides apresentando alongamento nuclear e cromatina em maior grau de condensação periférica (asteriscos). Detalhe para corte transversal (seta) mostrando axonema em configuração clássica 9+2, mitocôndrias (m) na peça intermediária e flagelo (f), (em 49:50.000 X; em 50:21.000X).



46



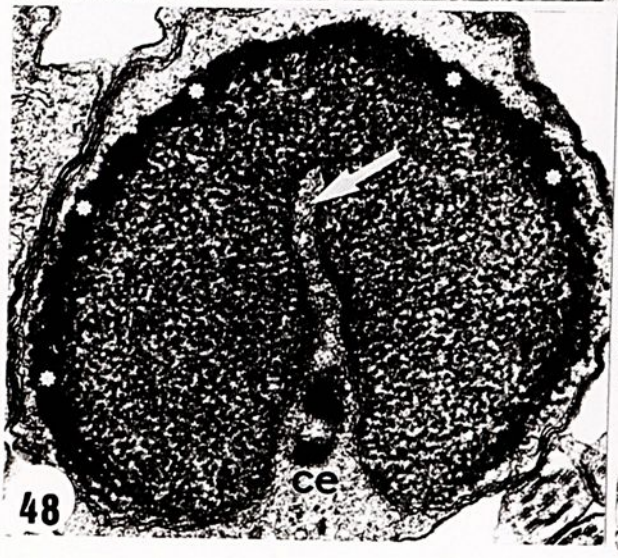
49



47



50



48

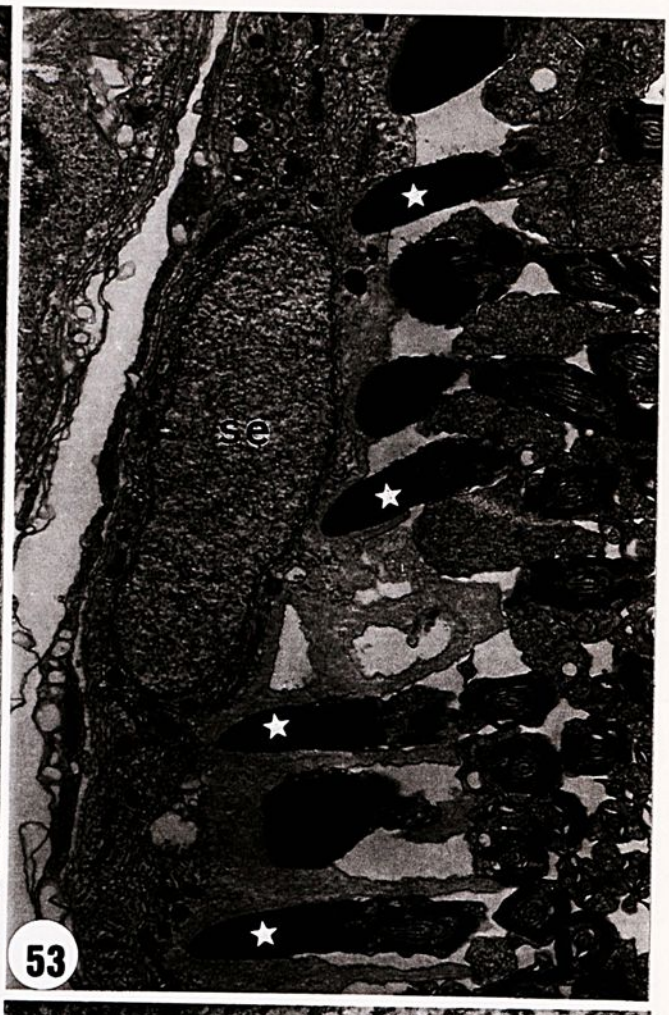
Fig.51. Destaque para espermátide madura de *Phalloceros caudimaculatus* apresentando núcleo alongado com cromatina altamente condensada (asterisco), mitocôndrias (m) na peça intermediária e flagelo (f), (27.500X).

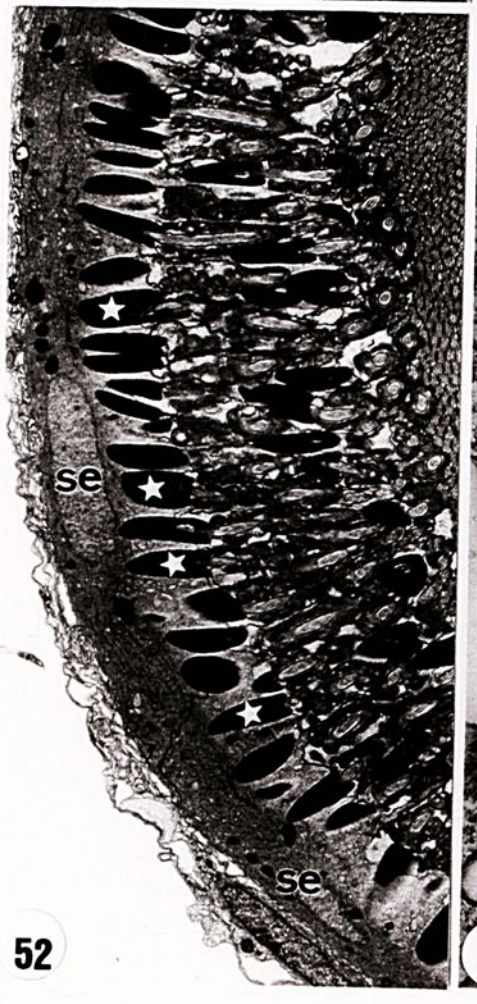
Figs.52 e 53. Vista da periferia de cistos germinativos de *Phalloceros caudimaculatus* evidenciando espermátides maduras (estrelas) associadas ao citoplasma de células de Sertoli (se), (em 52:5.000X, em 53:7.500X).

Fig.54. Detalhe da associação dos núcleos das espermátides maduras (estrelas) com o citoplasma de uma célula de Sertoli (se), (50.000X).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


51


se
53


se
se
52


se
54

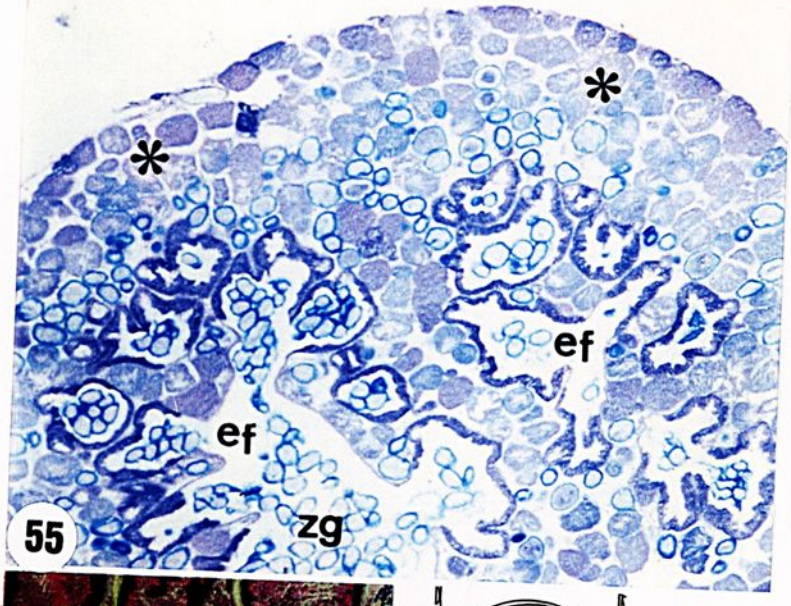
Fig. 55. Microscopia óptica de testículos fusionados (asteriscos) de *Phalloceros caudimaculatus* mostrando ductos eferentes (ef) contendo grupos de espermatozeugmatas (zg), (Metacromasia, pH 5,6 100X).

Fig. 56. Detalhe do testículo de *Phalloceros caudimaculatus* exibindo cistos de espermátides maduras (estrelas), espermátides jovens (ep), espermatócitos primários (cp) e região de espermatogônias (cabeças de setas), (H/E, 200X).

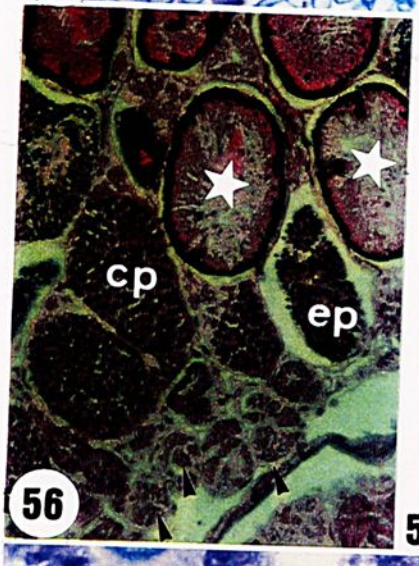
Fig. 57. Esquema de um túbulo seminífero espermatogonial restrito de *Phalloceros caudimaculatus*.

Fig. 58. Detalhe dos ductos eferentes (ef) contendo grupos de espermatozeugmatas (zg) com espermatozóides (setas) dispostos da mesma forma que apresentada pelas espermátides maduras no cisto germinativo, (Metacromasia, pH 5,6 200X).

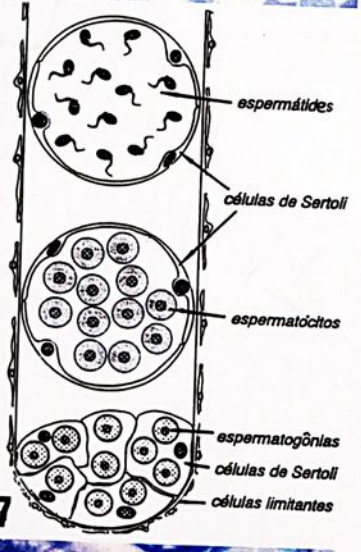
cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


*
*
ef
ef
zg

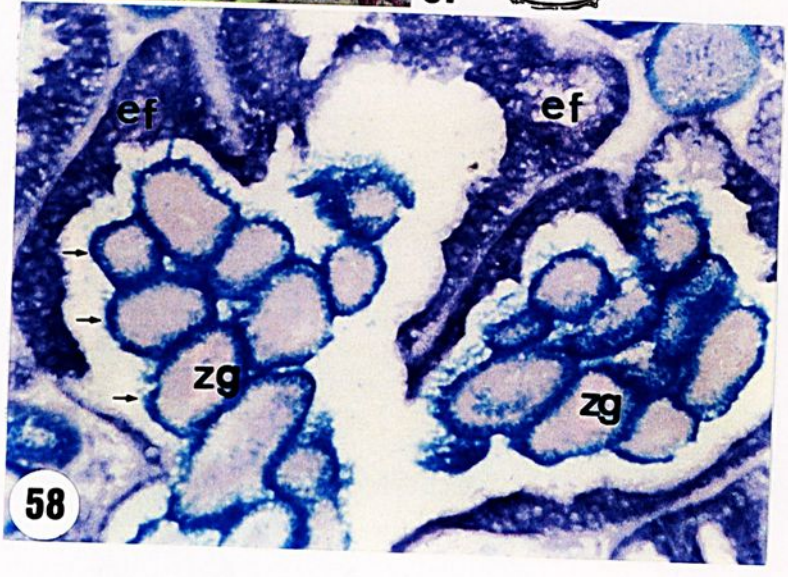
55


cp
ep

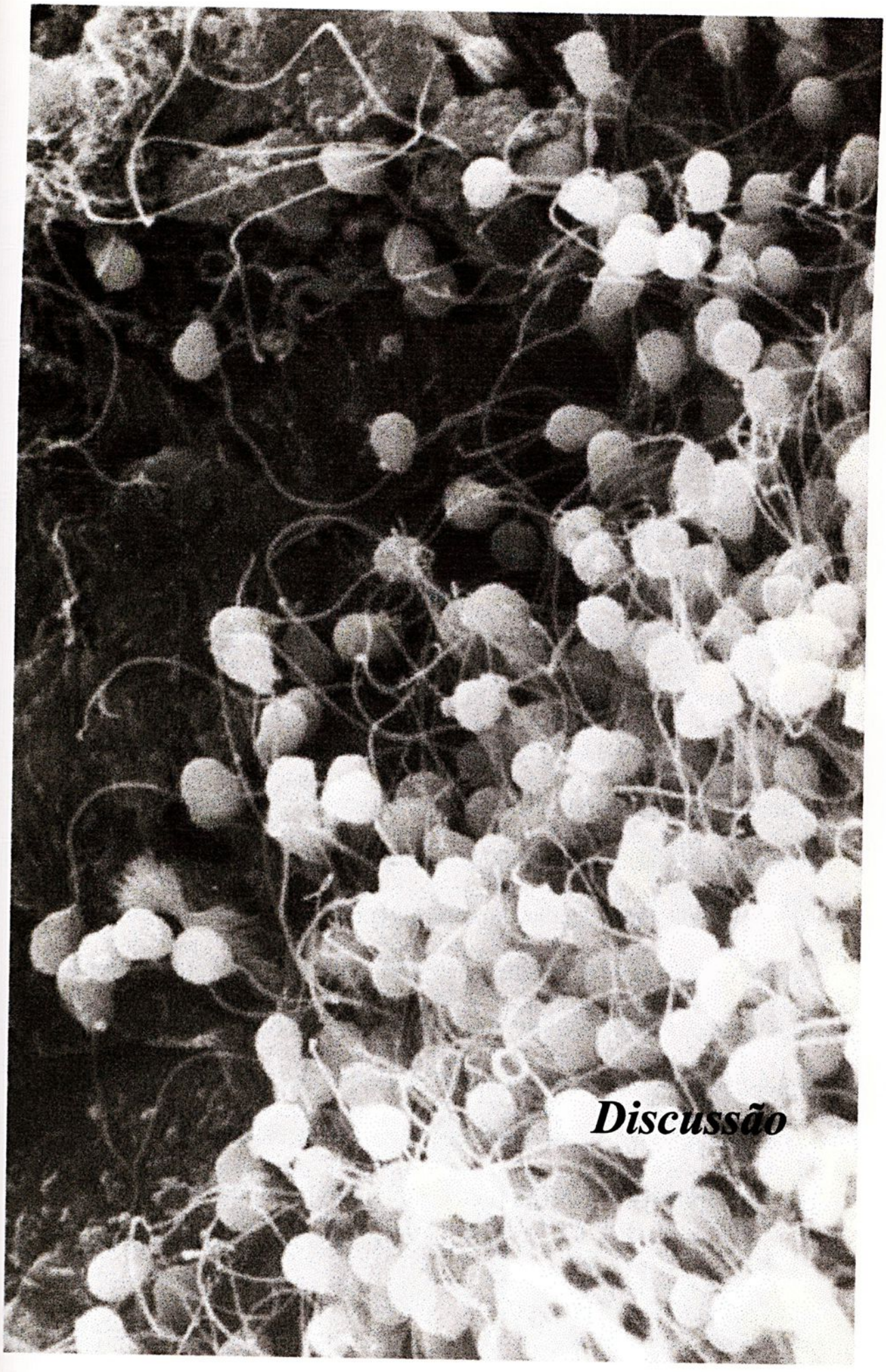
56


espermátides
células de Sertoli
espermatócitos
espermatogônias
células de Sertoli
células limitantes

57


ef
ef
zg
zg

58



Discussão

Os testículos de *Prochilodus scrofa* e de *Astyanax scabripinnis*, peixes teleósteos que apresentam fecundação externa, se caracterizam como estruturas pares; individualizadas na maior parte de sua extensão. São unidos apenas na extremidade caudal, e situados ventralmente à bexiga natatória, similarmente ao encontrado na truta arco-íris, *Salmo irideus* (ALEXANDRINO et al., 1987), no peixe canivete, *Parodon tortuosus* (AZEVEDO et al., 1988), no lambari, *Astyanax bimaculatus* (ANDRADE et al., 1985), no acará, *Geophagus brasiliensis* (BARBIERI et al., 1981), na piracamjuba, *Brycon orbignyanus* (ZAIDEN, 1997; AIRES, 1998) no piauçu *Leporinus macrocephalus* (ALVES DO AMARAL, 1999) e na piraputanga, *Brycon hilarii* (ZAIDEN, 2000).

Em geral a superfície testicular em teleósteos apresenta-se lisa conforme estudos realizados por AZEVEDO et al. (1988), ALEXANDRINO et al. (1985) e ALVES DO AMARAL (1999). Entretanto, em *Astyanax scabripinnis*, observamos por meio de microscopia eletrônica de varredura, durante a fase de maturação testicular, uma superfície irregular, com saliências provocadas pelo aumento de volume dos cistos germinativos. Por outro lado, BARBIERI et al. (1981) destacaram no *Geophagus brasiliensis*, que os testículos, na fase madura, apresentam bordas ("margens") sinuosas, quando analisados macroscopicamente.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Quanto às características morfológicas das gônadas de *Phalloceros caudimaculatus*, os estudos ultraestruturais de microscopia eletrônica de varredura, evidenciaram que os testículos apresentam-se fusionados por toda a extensão da face medial, similar ao observado em *Gambusia affinis* (FRAILE et al., 1992) e *Poecilia reticulata* (BILLARD, 1969).

Os estudos histológicos e ultraestruturais indicaram que os testículos de *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* são do tipo espermatogonial irrestrito, considerando a distribuição das espermatogônias primárias por toda a extensão dos túbulos seminíferos, similar ao descrito por GRIER et al. (1980), para espécies pertencentes às ordens Salmoniformes, Perciformes e Cipriniformes, e ao observado por ROMAGOSA et al. (1999) no matrinxã, QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO (1999) no *Sorubim lima*, ALVES DO AMARAL (1999) no piauçu, e ZAIDEN (2000) na piraputanga.

Por outro lado, em *Phalloceros caudimaculatus*, a distribuição das espermatogônias primárias corresponde ao descrito para testículos do tipo espermatogonial restrito, onde as células germinativas primárias são encontradas apenas no segmento distal dos túbulos seminíferos,

similarmente ao observado em Atheriniformes por GRIER et al. (1980) e na *Gambusia affinis holbrook* por FRAILE et al. (1992).

Ainda quanto à estrutura testicular, a literatura especializada apresenta controvérsias quanto à organização estrutural dos testículos de peixes teleósteos, em particular, quanto à existência de lóbulos ou túbulos seminíferos. Alguns autores utilizaram indistintamente os dois termos, para a caracterização da estrutura testicular (HENDERSON, 1962; SANWAL & KHANNA, 1972; DALELA et al., 1976; LEATHERLAND & SONSTEGARD, 1978; ALEXANDRINO et al., 1985). Entretanto, GRIER et al. (1980), estudando diversas espécies, referentes à quatro ordens de peixes teleósteos, utilizou o termo "túbulo seminífero" para a descrição dos tipos testiculares, espermatogonial restrito e irrestrito.

Em peixes neotropicais, o termo túbulo seminífero vem sendo amplamente utilizado por diversos pesquisadores (ANDRADE & GODINHO, 1983; ANDRADE et al., 1985; CRUZ-LANDIM & CRUZ-HÖFLING, 1986/1987; AGOSTINHO et al., 1987; ALEXANDRINO et al. 1987; AZEVEDO et al., 1988; SILVA & GODINHO, 1991; MATOS et al., 1993; MATOS et al., 1993a; MATOS et al., 1995; GUSMÃO et

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

al., 1999; ROMAGOSA et al., 1999; ALVES DO AMARAL, 1999, e VICENTINI et al., 2001).

Quanto ao *Prochilodus scrofa* VICENTINI et al. (2001), utilizando injeção de acetato de vinila, nos ductos espermáticos, observaram, em nível de microscopia eletrônica de varredura, que a via seminífera do curimbatá está formada por túbulos seminíferos anastomosados confluindo diretamente para o ducto testícular principal. Cabe destacar, ainda, que o compartimento seminífero ou intratubular apresenta-se formado por espermatogônias primárias e células de Sertoli, durante todo o ciclo reprodutivo, apesar da presença ou não de cistos germinativos.

Nas três espécies estudadas, independentemente do tipo testicular, espermatogonial restrito ou irrestrito, observamos que a espermatogênese caracteriza-se como cística, considerando que as células germinativas apresentam diferenciação sincrônica no interior dos cistos germinativos, conforme caracterizado por MATTEI et al. (1993).

Os estudos histológicos demonstraram que o ciclo reprodutivo anual de *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* estão constituídos de quatro estágios espermatogenéticos: repouso, maturação, maduro e

unesp

esgotado, similares ao descrito para *Leporinus silvestri* (ANDRADE, 1980) e para o próprio curimbatá (ALEXANDRINO et al., 1985).

Em condições de confinamento, ANDRADE et al. (1985) avaliaram o ciclo reprodutivo anual de lambaris, da espécie *Astyanax bimaculatus*. Os autores destacaram que ocorreu espermatogênese ativa durante todo o ano. A desova foi observada de agosto a maio e processou-se parceladamente. O período de reprodução foi coincidente com o aumento das horas diárias de luz solar, com o aumento da temperatura da água e com o índice pluviométrico. Por outro lado, BARBIERI et al. (1982) verificaram em lambaris, da represa do lobo (Broa), em São Carlos, período reprodutivo restrito aos meses de setembro a dezembro.

No presente estudo, por outro lado, não observamos variações morfológicas testiculares sazonais definidas em *Phalloceros caudimaculatus*. Esta espécie apresenta intensa proliferação celular, com cistos germinativos presentes durante todos os meses do ano. Em contrapartida, a *Gambusia affinis* (FRAILE et al., 1992), que se caracteriza também por apresentar testículo do tipo espermatogonial restrito, apresenta ciclo reprodutivo composto de dois períodos, o espermatogênico e o quiescente.

Cabe ressaltar que a *Gambusia affinis* apresenta espermatogônias primárias e espermatozóides, durante todo o ano. No período de quiescência testicular, as espermatogônias visualizadas marcam o início de um novo ciclo espermatogenético, que ocorrerá sob condições ambientais e hormonais favoráveis. Já os espermatozóides presentes neste mesmo período, constituem células oriundas do período espermatogenético anterior, e permanecem estocados até a época da próxima desova (FRAILE et al., 1992). Estas peculiaridades, não são apresentadas pelo *Phalloceros caudimaculatus*, que habita regiões de clima tropical. Já a *Gambusia affinis* é encontrada em regiões de clima temperado, com períodos de inverno e verão bem definidos e rigorosos.

Quanto às características ultraestruturais da espermatogênese, em *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* e *Phalloceros caudimaculatus*, observamos que as espermatogônias primárias são circundadas por expansões citoplasmáticas das células de Sertoli, independente da fase ou estágio do ciclo reprodutivo em que se encontram.

A evidência de espermatogônias primárias, durante todos os meses do ano, suporta o conceito de que estas produzam, por multiplicação sucessiva e posterior diferenciação, novas gerações de células

germinativas (GRIER, et al., 1980; FRAILE et al., 1992), independentemente da estrutura testicular observada (espermatogonial restrito ou irrestrito).

No citoplasma das espermatogônias é freqüente a presença de "nuages" ou cimento intermitocondrial, conforme observado em nossas ilustrações. Estas estruturas foram descritas por CLEROT (1976) em ciprinídeos e observadas também em peixes neotropicais (ANDRADE & GODINHO, 1983; SILVEIRA et al., 1990; ROMAGOSA et al., 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999; ZAIDEN, 2000). Segundo QUAGIO-GRASSIOTTO & LELLO (1995), as "nuages" apresentam-se como material eletrondenso, no citoplasma, não sendo envolto por membrana, e constituem uma característica das células germinativas. Tais estruturas são constituídas de RNA e proteínas de origem nuclear, que migram para o citoplasma através dos poros nucleares.

Em *Surubim lima* (QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, (1999) destacaram a presença de "lamellae annulata", como sendo organelas transitórias constituintes de um sistema de cisternas com poros, similares aos poros nucleares. Segundo KESSEL (1981), os poros da "lamellae annulata" estão associados com a ativação de produtos

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

gênicos tais como RNA ribossômico e RNA mensageiro, dispostos na densa massa citoplasmática. Entretanto, não encontramos a presença de "lamellae annulata" nas espécies estudadas.

As espermatogônias secundárias são visualizadas em *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis*, tanto isoladamente como no interior do cisto germinativo, similar ao encontrado em outros peixes neotropicais (ROMAGOSA et al., 1993; ROMAGOSA et al., 1999).

Ultraestruturalmente, os espermatócitos primários apresentam, nas três espécies estudadas, características similares entre si. Os espermatócitos secundários foram raramente observados no interior de cistos, concomitantemente com espermatócitos primários em divisão, conforme observado na *Gambusia affinis* (DE MIGUEL, 1992).

O processo de espermiogênese apresenta características ultraestruturais peculiares a cada uma das espécies estudadas. O *Prochilodus scrofa* apresentou compactação gradual da cromatina das espermátides, atingindo máxima compactação na espermátide madura, quando os grânulos de cromatina formam grumos, dando ao núcleo um aspecto muito eletrondenso. Estas características são similares ao observado na curvina de água doce, *Plagioscion squamosissimus*

(GUSMÃO et al., 1999). Na curvina entretanto, o núcleo sofre um processo de lateralização, diferente do observado no curimbatá, onde o núcleo da espermátide mantém-se no mesmo eixo do centríolo distal, que dará origem ao flagelo. Durante o processo de compactação da cromatina, não ocorre alongamento do núcleo, resultando na formação de espermatozóides de cabeça arredondada, de modo similar ao observado no matrinxã (SILVEIRA, 2000). Cabe destacar que na literatura, não encontramos estudos ultraestruturais sobre o processo de espermiogênese no *Prochilodus scrofa*.

Quanto ao *Astyanax scabripinnis*, durante o processo de espermiogênese, ocorre uma compactação rápida e uniforme da cromatina. Apesar de não encontrarmos característica similar na literatura, o aspecto da cromatina dos espermatozóides desta espécie é semelhante ao descrito para o *Cremicicla saxantilis* (MATOS, et al., 1995) e para o pacu, *Metynnis maculatus* (MATOS et al., 1993).

Referente às características ultraestruturais dos espermatozóides de *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis*, observamos que estes estão constituídos por cabeça arredondada, sem acrossoma, peça intermediária curta e flagelo longo, semelhante ao descrito para outros peixes teleósteos (GRIER, 1981; CRUZ-LANDIM & CRUZ-HÖFLING,

1986/1987; MATTEI, 1988; BILARD, 1983; ROMAGOSA, 1991; AIRES, 1998; ROMAGOSA, et al., 1999; ZAIDEN, 2000).

A cauda do espermatozóide em teleósteos é basicamente composta pelo flagelo, que é responsável pela propulsão da célula. Este tem a função de manter a eficiência do movimento dos espermatozóides (BACCETTI, 1970). O flagelo dos espermatozóides de *Prochilodus scrofa e Astyanax scabripinnis* apresenta configuração clássica do tipo 9+2, similar ao encontrado em outras espécies de peixes neotropicais (ROMAGOSA, 1991; MATOS et al., 1993; ROMAGOSA et al., 1999; GUSMÃO et al., 1999).

Em *Phalloceros caudimaculatus*, durante o processo de espermiogênese, observa-se compactação ou condensação da cromatina, partindo da periferia até chegar à região central do núcleo. Este processo é concomitante ao alongamento do núcleo, resultando na formação de feixes de espermatozóides com cabeça alongada, denominados de espermatozeugmatas. Estas características são semelhantes à encontradas na *Gambusia affinis* (GRIER, 1975a; FRAILE et al., 1992), *Poecilia latipinna* (GRIER, 1975b) e nas espécies da família *Goodeidae* (GRIER et al., 1978).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Segundo GRIER et al. (1978) os *Poeciliidae* e *Goodeidae*, são famílias de teleósteos intimamente relacionadas, que apresentam modificação testicular específica referente à formação de espermatozeugmatas. Esta característica faz parte de muitos requisitos necessários para que a fertilização interna possa ocorrer.

Nas duas famílias acima citadas, o desenvolvimento morfológico das células germinativas e das células de Sertoli é muito relacionado. Durante a fase de espermiogênese, as espermátides em desenvolvimento eliminam o excesso de citoplasma no interior do cisto. As células de Sertoli posteriormente fagocitam estes corpos residuais (GRIER, 1975b) e sofrem um aumento simultâneo dos volumes citoplasmático e nuclear. A fagocitose dos corpos residuais por células intratubulares no testículo de teleósteos é uma característica funcional utilizada para a identificação das células de Sertoli em teleósteos (GRIER 1975b; GRIER & LINTON, 1977).

Segundo GRIER et al. (1978), apesar da similaridade da estrutura testicular em *Poeciliidae* e *Goodeidae*, os espermatozeugmatas formados nos testículos são diferentes. Em *Poeciliidae* as cabeças das espermátides se voltam para a periferia do cisto germinativo e se ancoram no citoplasma das células de Sertoli, similarmente ao observado

em nossos estudos para *Phalloceros caudimacultus*. Entretanto, em *Goodeidae*, é o flagelo da espermátide em desenvolvimento que se associa com a célula de Sertoli, exibindo no local de contato uma zona bastante eletrondensa (GRIER, 1975b).

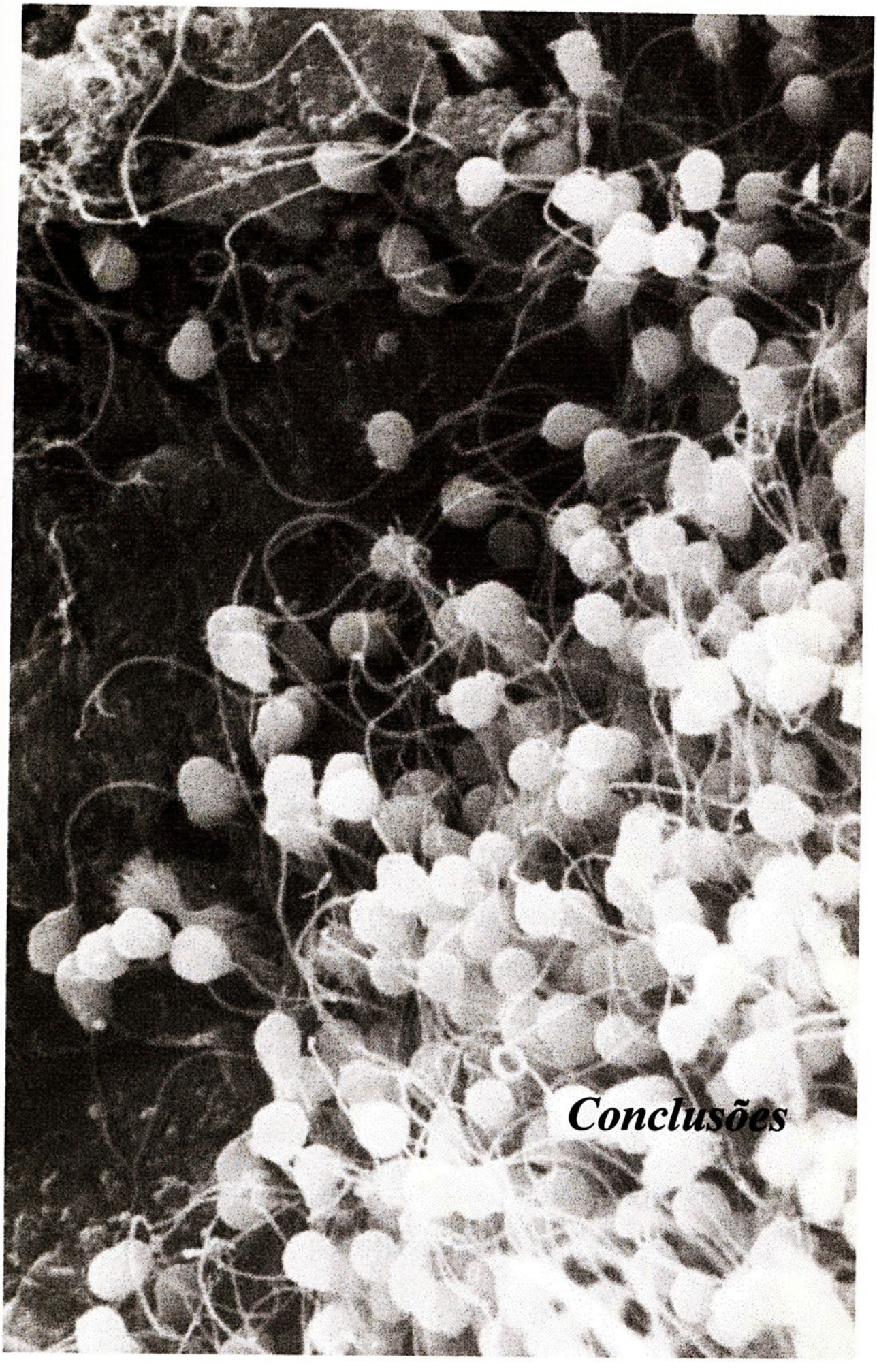
Estudos realizados nas células de Sertoli de muitas espécies revelaram que os filamentos de actina, que compõem o citoesqueleto destas células, são abundantes, porém sua localização varia muito de um grupo para outro, dentre os vertebrados (BACCETTI et al., 1983; BERNARDINI et al., 1990; PFEIFFER & VOGL, 1992).

Em *Gambusia affinis*, estudos realizados nas células de Sertoli revelaram que estas células apresentam especializações de membrana em duas regiões bem definidas, envolvendo os filamentos de actina. O contato entre as células de Sertoli e as espermátides alongadas seria uma das regiões, e as junções entre as células de Sertoli constituiriam a outra região. Possivelmente as funções dos filamentos de actina nas células de Sertoli de *Gambusia affinis* estejam relacionadas com a adesão destas células ao tecido subjacente, adesão entre as células de Sertoli, ou ainda posicionamento das células espermatogênicas e alongamento das espermátides (ARENAS et al., 1995).

unesp

A despeito de todas as considerações citofisiológicas feitas anteriormente, pelos autores citados, acreditamos, com base em nossas observações, que nos túbulos seminíferos das três espécies estudadas, as células de Sertoli têm papel fundamental de empacotamento das células germinativas, visando formar os citos espermatogenéticos ou germinativos, cuja estrutura foi amplamente descrita neste trabalho.

unesp



Conclusões

Os estudos espermatogenéticos realizados em *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* e *Phalloceros caudimaculatus*, permitiram elaborar as seguintes conclusões:

1- Os testículos de *Prochilodus scrofa* e de *Astyanax scabripinnis* correspondem ao tipo espermatogonial irrestrito, considerando a distribuição das espermatogônias primárias por toda a extensão dos túbulos seminíferos.

2- Os testículos de *Phalloceros caudimaculatus* apresentam características do tipo espermatogonial restrito, considerando que as espermatogônias primárias estão restritas à extremidade distal dos túbulos seminíferos.

3- As três espécies analisadas apresentam espermatogênese cística, com desenvolvimento sincrônico das células germinativas no interior dos cistos espermatogenéticos.

4- O ciclo reprodutivo ou espermatogenético de *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* apresenta quatro estágios característicos: repouso, maturação, maduro e esgotado,

unesp

diferindo do encontrado em *Phalloceros caudimaculatus*, que apresenta intensa proliferação celular durante todos os meses do ano.

5- O processo de espermiogênese das três espécies estudadas apresenta características ultraestruturais distintas. No *Prochilodus scrofa* ocorre compactação gradual da cromatina das espermátides, resultando na formação de grumos eletrondensos. Entretanto, em *Astyanax scabripinnis* foi evidenciado um processo rápido de compactação, com grânulos homogeneamente distribuídos. No *Phalloceros caudimaculatus* observa-se compactação gradual da cromatina, da periferia para o centro do núcleo. Simultaneamente, processa-se o alongamento do núcleo da espermátide.

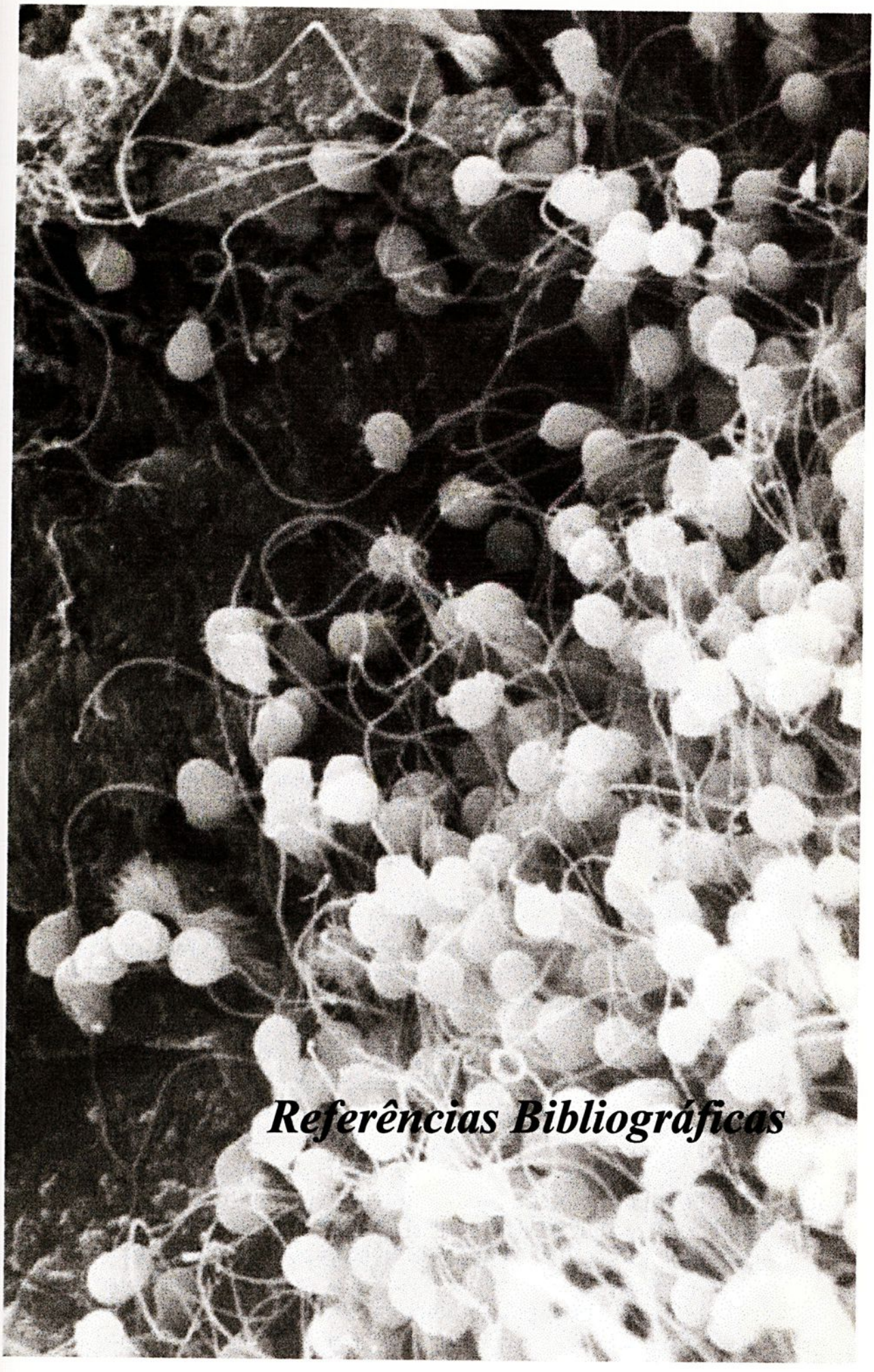
6- Os espermatozóides de *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* possuem cabeça arredondada, peça intermediária curta e flagelo com axonema do tipo 9 + 2.

7- Em *Phalloceros caudimaculatus* após o processo de espermiogênese, são liberados grupos de espermatozóides

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

denominados espermatozeugmatas, com cabeça alongada, peça intermediária e flagelo com axonema do tipo 9 + 2.

8- As células de Sertoli, nas três espécies estudadas apresentam função de empacotamento das células germinativas, visando a formação de cistos espermatogenéticos. Somente em *Phalloceros caudimaculatus* ocorrem associações entre células germinativas maduras, com o citoplasma das células de Sertoli.



Referências Bibliográficas

AFZELIUS, B.A. Fine structure of the garfish spermatozoon. **J. Ultrastruct. Res.**, v.64, p.309-314, 1978.

AGOSTINHO, A.A., BARBIERI, M.C., AGOSTINHO, C.S., BARBIERI, G. Biologia reprodutiva de *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829), (Teleostei, Loricariidae) no rio Paranapanema. I. Estrutura dos testículos e escala de maturidade. **Rev. Bras. Biol.**, v.47, p.309-317, 1987.

AIRES, E.D. **Características morfológicas e histofisiológicas da via espermática da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Pisces: Teleostei)**. 1998, 69f. Tese (Doutorado em Anatomia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ALEXANDRINO, A.C., PHAN, M.T., PINHEIRO, E.F.G. Caracterização macroscópica e microscópica da gônadas do curimbatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. **Bol. Zool. Univ. S. Paulo**, v.9, p.159-75, 1985.

ALEXANDRINO, A.C., PINHEIRO, E.F.G., RIGOLINO, M.G., CAMPOS, E.C. ARANA, S. Ciclo reprodutivo de *Salmo irideus* Gibbons (Pisces, salmoniformes) mantidos em sistema de cultivo intensivo: caracterização macroscópica e microscópica dos testículos. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo.**, v.24 (2), p.169-180, 1987.

ALVES DO AMARAL, A. **Ciclo reprodutivo anual em machos de *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988) (Pisces,**

Characiformes, Anostomidae). 1999, 64f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ANDRADE, D.R. **Variação cíclica anual da espermatogênese em *Leporinus silvestri* (Boulenger, 1902) Peixe, Teleósteo.** 1980, 87f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANDRADE, D.R. & GODINHO, H.P. Annual male reproductive cycle of the brazilian teleost fish *Leporinus silvestrii* (Boulenger, 1902). **Arch. Biol.**, v.94, p.1-14, 1983.

ANDRADE, D.R., GODINHO, H.P., RIBEIRO, S.P., CASTRO, E.F.T. Ciclo reprodutivo anual de lambaris (*Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758) em viveiros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.37 (5), p.435-437, 1985.

ARENAS, M.I., FRAILE, B., DE MIGUEL, M.P., PANIAGUA, R. Cytoskeleton in Sertoli cells of the mosquito fish (*Gambusia affinis holbrooki*). **Anat. Rec.**, v.241, p.225-234, 1995.

AZEVEDO, C. O., BARBIERI, M.C., BARBIERI, G. Ciclo reprodutivo de *Paradon tortuosus* (Eigenmann and Norris, 1900) do rio Passa-Cinco, Ipeúna – SP. I Estádios de maturação dos testículos. Época de reprodução. **Rev. Brasil. Biol.**, v.48 (3), p.565-569, 1988.

BACCETTI, B. **Comparative spermatology.** Academic Press, New York, p.169-182, 1970.

BACCETTI, B., BIGLIARDI, E., TALLURI, M.V., BURRINI, A.G. The Sertoli cell in lizards. **J.Ultrastruct. Res.**, v.85, p.11-23, 1983.

BAILEY, C. Aquaculture and basic human needs. **World Aquaculture.**, Baton Rouge, v.28, n.3, p.28-31, 1997.

BARBIERI, M.C., BARBIERI, G., MARINS, M.A., Sobre a anatomia e histologia do testículo de *Geophagus brasiliensis* (Quoy and Gaimard, 1824) na represa do Lobo (SP). **Rev. Bras. Biol.**, v.41, p.169-173, 1981.

BARBIERI, G., SANTOS, M.V., SANTOS, J.M. Época de reprodução e relação peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesqui. Agropec. Bras.**, v.17 (7), p.1057-1065, 1982.

BERNARDINI, G., PODINI, P., MACI, R., CAMATINI, M. Spermiogenesis in *Xenopus laevis*: from late spermatids to spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, v.26, p.347-355, 1990.

BHATTI, M.N., AL-DAHAM, N.K., Annual cyclical changes in the testicular activity of a fresh water teleost, *Barbus luteus* (Heckel) from Shatt-Al-Arab, Iraq. **J. Fish. Biol.**, v.13, p.321-326, 1978.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

BILLARD, R. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v.9 (2), p.251-271, 1969.

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

BILLARD, R. FOSTIER, A., WEII, C., BRETON, B. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, s.1. v.39, p.65-79, 1982.

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

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.26, p.877-1024, 1986.

CASTAGNOLLI, N. & CYRINO, J.E.P. Desova induzida do curimbatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Ciênc. e Cult.**, v.32 (9), p.1245-1253, 1980.

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

CRUZ-HÖFLING, M.A. & CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructural and histochemical studies on the Leydig and Sertoli cell homologues in

the testis of *Triportheus elongatus* (sardinhão) and *Mylossoma aureum* (pacu). **Cytobios.** v.41, p.161-174, 1984.

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

DALELA, R.C., RANI, S., VERMA, R. Comparative study of morphohistology of gonads of three teleost fishes. **Gegenb. Morph. Jahrb.**, v.122, p.570-585, 1976.

DE MIGUEL, M.P. **Estudio histológico y ultraestructural del testiculo de *Gambusia affinis holbrooki* (Teleostei, Poeciliidae). Efectos del fotoperiodo y de la temperatura.** 1992. 110f. Tesis Doctoral – Facultad de Ciencias, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, Alcalá de Henares.

DE MIGUEL, M.P., FRAILE, B., SÁEZ, F.S., VICENTINI, C.A., PANIAGUA, R. Influence of ocular and extraocular photoreception on spermatogenesis in *Gambusia affinis holbrooki* (Teleostei: Poeciliidae). **J. Exp. Zool.**, v.269, p.367-372, 1994.

FÁVARO, T. Lambari ganha mercado, na pesca e na mesa. **Suplemento Agrícola**, O Estado de São Paulo, nº 2.427, p.6-7, 2002.

FENERICH-VERANI, N., GODINHO, H.M., NARAHARA, M.Y. The size composition of the eggs of curimbatá, *Prochilodus scrofa*,

Steindachner 1881, induced to spawn with human chorionic gonodotropin (HCG). **Aquaculture**., v.42, p.37-41, 1984.

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

FRAILE, B., SÁEZ, F.J., VICENTINI, C.A., DE MIGUEL, M.P., PANIAGUA, R. Effects of photoperiod on spermatogenesis in *Gambusia affinis holbrooki* (Teleostei: Poeciliidae) during the period of testicular quiescence. **J. Zool.**, v.230, p.651-658, 1993.

FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arq. Zool. Est. São Paulo.**, v.6 (2), p.205-404, 1951.

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.

GRIER, H.J. Spermiogenesis in the teleost *Gambusia affinis* with particular reference to the role played by microtubules. **Cell Tiss. Res.**, v.165, p.89-102, 1975a.

GRIER, H.J. Aspects of germinal cyst and sperm development in *Poecilia latipinna* (Teleostei, Poeciliidae). **J. Morphol.**, v.146, p.229-250, 1975b.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

GRIER, H.J., Sperm development in the teleost *Oryzias latipes*, **Cell. Tissue Res.**, v.168, p.419-432, 1976.

GRIER, H.J. & LINTON, J.R. Ultrastructural identification of the Sertoli cell in the testis of the northen 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. Morph.**, v.156, p.419-438, 1978.

GRIER, H.J., LINTON, J.R., LEATHERLAND, J.F., DE VLAMING, V.L. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. **Amer. J. Anat.**, v.159, p.331-45, 1980.

GRIER, H.J., Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **Amer. Zool.**, v.21, p.345-357, 1981.

GRIER, H.J. Chordate Testis: The extracellular matrix hypothesis. **J. Exper. Zool.**, v.261, p.151-160, 1992.

GODOY, M.P. Locais de desova de peixes num trecho do rio Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Brasil. Biol.**, v.14(4), p.375-396, 1954.

GURAYA, S.S., Recent advances in the morphology, histochemistry, and biochemistry of steroid synthesizing cellular

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

sites in the testes of nonmammalian vertebrates. **Int. Rev. Cytol.**, n.1, v.47, p.99-136, 1976.

GUSMÃO, P., FORESTI, F., QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructure of spermiogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). **Tiss. Cell**,v.31 (6), p. 627-633, 1999.

HANN, H.W. The history of the germ cells of *Cottus baiardii* Girard. **J. Morphol.**, v.43, p.427-497, 1927.

HENDERSON, N.E., The anual cycle in the testis of eastern brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), **Can. J. Zool.**, v.40, p.631-641, 1962.

IHERING, R. von., **Dicionário dos animais do Brasil**. Rio de Janeiro, Fidel, 588p., 2002.

ILIADOU, K., FISHELSON, L. Histology and cytology of testes of the catfish *Parasilurus aristotelis* (Siluridae, Teleostei) from Greece. **Jap. J. Ichtyol. Gyoruigaku Zasshi.**, v.14, p.447-454, 1995.

JAMES, M.F. Histology of gonadal changes in the blue-gill, *Lepomis macrochirus rafinesque*, and the largemouth bass *Huro salmoides*. **J. Morphol. Physiol.**, v.79, p.63-89, 1946.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

JAMIESON, B.G.M. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge University Press, Cambridge, USA., 1991.

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. & BUTLER, R.D. Spermatozoon ultrastructure of *Plastichtys flesus*. **J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res.** , v.98, p.71-82, 1988.

JOSHI, K.D. & JOSHI, P.C. Seasonal cycle of testicular maturation and intersticial cell activity in the hill-stream teleost, *Puntius dukai*. **Indian J. Fish.**, v.36, nº1, p.58-64, 1989.

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 fine structure of spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces, Teleostei). **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.23 (3), p.373-377, 1991.

LAHNSTEINER, F., PATZNER, R.A., WEISMANN, T. Testicular main ducts and spermatic ducts in some cyprinid fishes I.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Morphology, fine structure and histochemistry. **J. Fish. Biol.**, v.44, p.937-951, 1994.

LEATHERLAND, J.F., SONSTEGARD, R.A. Structure of normal testis and testicular tumors in Cyprinids form Lake Ontario. **Cancer Res.**, v.38, p.3164-3173, 1978.

LEITE, R.G. Estudos biométricos do curimbatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881, em experimentos de cultivo com suprimento alimentar. II. Crescimento. **Anais do III Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**, São Carlos, SP., 1984.

LOFTS, B., PICKFORD, G.E., ATZ, J.W. Effects of methyl testosterone on the testes of a hupophysectomized cyprinodont fish, *Fundulus heteroclitus*, **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.6, p.74-88, 1966.

LOPES, R.A., LOPES, O.V.P., PAULA, C.V., DOS SANTOS, H.S.L., NUTI-SOBRINHO, A. , On the reproduction of brazilian fishes, IX. Spermatogeneis of the surubim *Pseudoptatystoma corruscans*, Agassiz 1829 (Pisces, Pimelodidae). **Ars Vet.**, v.3, p.17-22, 1987.

MARTOJA, R. & MARTOJA-PIERSON, M., **Técnicas de Histologia Animal**, Barcelona, Toray-Masson, 350p.,1970.

MATTEI, X., BOISSON, C., MATTEI, C., REIZER, C. Spermatozoides aflagellés chez un poisons: *Gymnarchus niloticus*

(Téléostéen, Gymnarchidae). **C.R. Acad. Sci.**, v.265, p.2010-2012, 1967.

MATTEI, X. Spermiogènese comparée des poison. In: BACETTI, B. **Comparative Spermatology**, New York, Academic Press, p.57-72, 1970.

MATTEI, X. The flagella apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. **Biol. Cell.**, v.63, p.151-158, 1988.

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.

MATOS, E., MATOS, P., OLIVEIRA, E., AZEVEDO, C. Ultraestrutura da espermatogênese do tamoatá, *Hoplosternum littorale* (Hancock) (Teleostei, Callichthyidae) do rio Amazonas. **Revista Bras. Zool.**, v.10 (2), p.219-227, 1993.

MATOS, E., MATOS, P., OLIVEIRA, E., AZEVEDO, C. Ultraestrutura do espermatozóide do pacu *Metynnis maculatus* Kner, 1860 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. **Rev. Bras. Ciên. Morfol.** v.10 (1), p.7-10, 1993a.

MATOS, E., MATOS, P., CORRAL, L., AZEVEDO, C. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Crenicichla saxatilis* Linnaeus, 1758 (Pisces, Teleostei) from the Amazon region. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.12 (2), p.109-114, 1995.

MENDONÇA, 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.

NAKAGHI, L.S.O. **Estudos estruturais e ultraestruturais das gônadas do peixe híbrido tambacu.** 1996. 108f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

NARAHARA, M.Y. **Estrutura da população e reprodução de *Rhamdia hilarii*** (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). 1983 Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

NICANDER, L. **Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa**. In BACETTI, B. *Compartive Spermatology*, 1970, p.47-55, Academic Press, N. York.

NICHOLLS, T.L. & GRAHAM, G.P., The ultrastructure of lobule boudary cells and Leydig cell homologs in the testis of a cichlid, *Cichlasoma nigrofasciatum* **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.19, p.133-146, 1972.

O'HALLORAN , M.J. & IDLER, D. R., Identification and distribution of the Leydig cell homolog in the testis of sexually mature Atlantic salmon (*Salmo salar*), **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.15, p.361-364, 1970.

OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J.R., PEDINI, M. **Situação atual da aqüicultura brasileira e mundial.** In: VALENTI, W.C. Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, 399p., 2000.

PADUA, D.M.C. **Fundamentos de Piscicultura**. Goiânia, 2ª Ed. rev. aument., Ed. da UCG, 341p., 2001.

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 Espana, S.A., 970p., 1997.

PFEIFFER, D.C. & VOGL, A.W. Actin filaments associated with the basal Sertoli cell surface in the alligator and turtle. **Tiss. Cell**, v.24, p.643-654, 1992.

PLÖEN, L. & COURTENS, J.L. Comparative aspects of mammalian spermiogenesis. **Scan. Elect. Microsc.**, v.2, p.107-120, 1986.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I., LELLO, E. Occurrence of "nuages" and "lamellae anulata" during spermatogenesis in *Dermatobia*

hominis (Diptera: Cuterebridae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.**, v.90, p.537-545, 1995.

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

RASTOGI, R.K. Histology and seasonal changes of spermary of the garfish *Xenetodon 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.

RICARDO, M.C.P., AGUIAR, C.A., RIZZO, E., BAZZOLI, N. Morfologia da micrópila e da célula micropilar em teleósteos neotropicais de água doce. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.48, p.17-24, 1996.

ROBERTSON, O.H., Accelerated development or testis after unilateral gonadectomy, with observations on normal testis of rainbow trout. **Fish Bull.**, v.58, p.9-12, 1958.

ROMAGOSA, E., NARAHARA, M.Y., GODINHO, H.M. Tipo de desova do curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, São Paulo. **B. Inst. Pesca**, v12 (4), p.1-5, 1985.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

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**. 1991. 177f. Tese - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro.

ROMAGOSA, E., NARAHARA, M.Y., TALMELLI, E.A., BRAGA, F.M.S. Mudanças morfológicas dos testículos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. **Revista Unimar**, v.15, p.1-17, 1993.

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 (6), p.540-544, 1999.

RUBY, S.M., & Mc MILLAN, D.B. Cyclic changes in the testis of the brook sticleblack *Eucalia incostans* (Kirtland). **J. Morph. Physiol.**, v.131, p.447-465, 1970.

SANWAL, R. & KHANNA, S.S., Seasonal changes in the testis of a freshwater fish *Channa gachua*, **Acta Anat.**, v.82, p.139-148, 1972.

SHANBRAG, A.B. & 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.

SCHUBART, O. A classificação dos estados sexuais do curimbatá. **B. Min. Agric.**, v.36, p.1-13, 1947.

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

SHRIVASTAVA, 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.

SILVA, M. **Morfologia ultraestrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemo-testicular da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, (Peixe, Ciclídeo).** 1987, Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

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.

SILVEIRA, A.N. **Caracterização espermática, preservação criogênica e fertilidade do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1860) (Teleostei, Characidae).** 2000, 46f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

THIAW, O.T., MATTEI, X., ROMAND, R., MARCHAND, B. Reinvestigation of spermatic flagella structure: The teleostean

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Cyprinodontidae. **J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.,** v.97, p.109-118, 1986.

TOURY, R., CLÉROT, J.C., ANDRÉ, J. Les groupments mitochondriaux des cellules germinales des poissons teleostéens cyprinides.IV Analyses biiochimique 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.

VALENTI, W.C., POLI, C.R., PEREIRA, J.A., BORGHETTI, J.R. **Aqüicultura no Brasil**: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, 399p., 2000.

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

VAZZOLER, A.E.A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá, EDUEM/SBI/CNPQ/Nupelia, 169p., 1996.

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 (3), p.357-362, 2001.

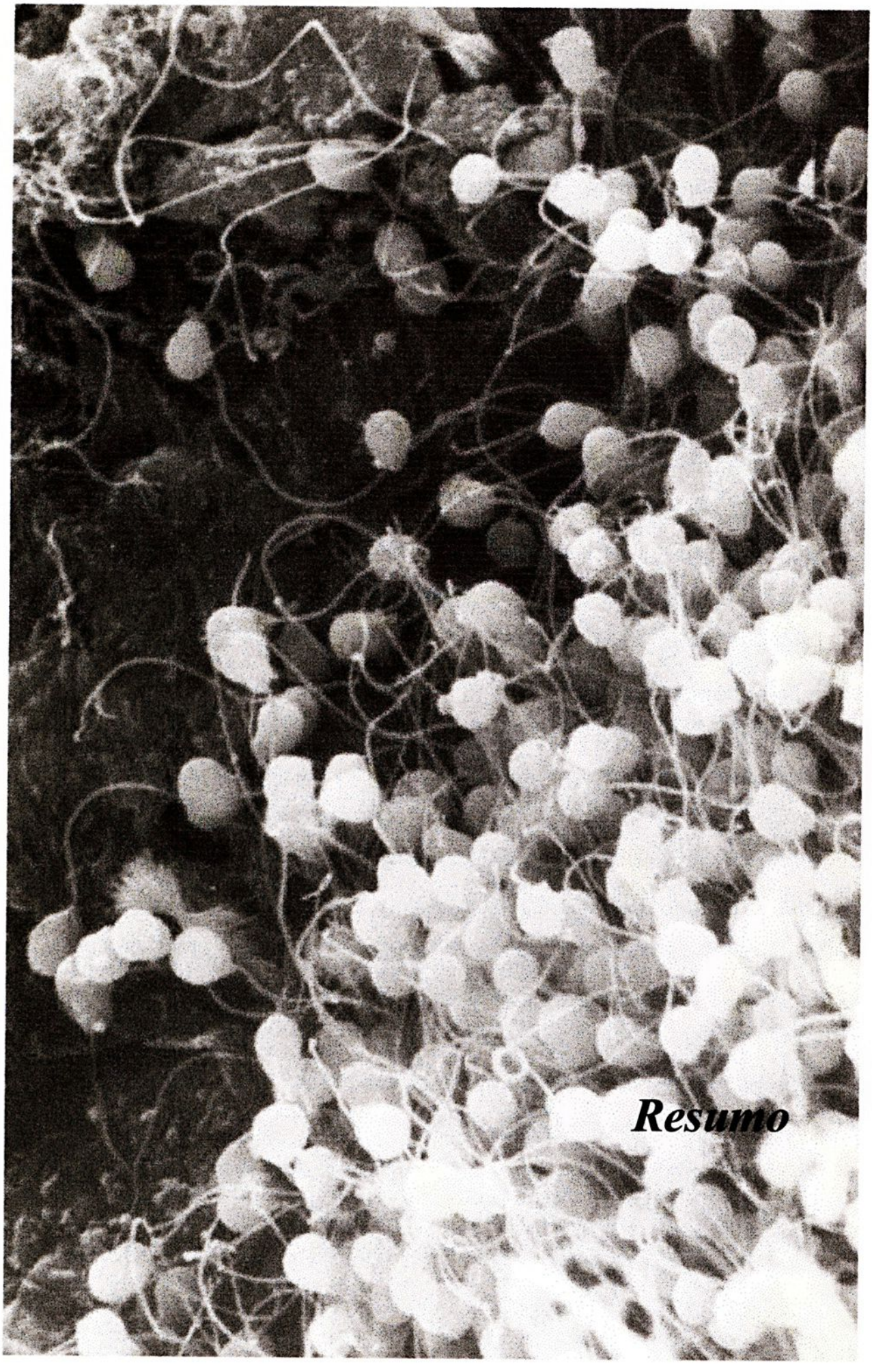
cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

VLAMING, V.L. **Environmental and endocrine control of teleost reproduction**. In: Control and Sex in Fishes. C.B. Schreck, ed. Blacksburg, Virginia, Department of Fisheries and Wildlife Sciences, Virginia Plytechbic Institute and State University, Blacksburg, p.13-83, 1974.

YARON, Z. Demonstration of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in the testis of *Tilapia mossambica* (Cichidae, Teleostei), **J. Endocrinol.**, v.34, p.127-128, 1966.

ZAIDEN, S.F. **Estrutura testicular da piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), nos vários estádios do ciclo sexual.** 1997. 78f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ZAIDEN, S.F. **Morfologia gonadal e metabolismo energético da piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativeiro, durante o ciclo reprodutivo anual.** 2000. 152f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.



Resumo

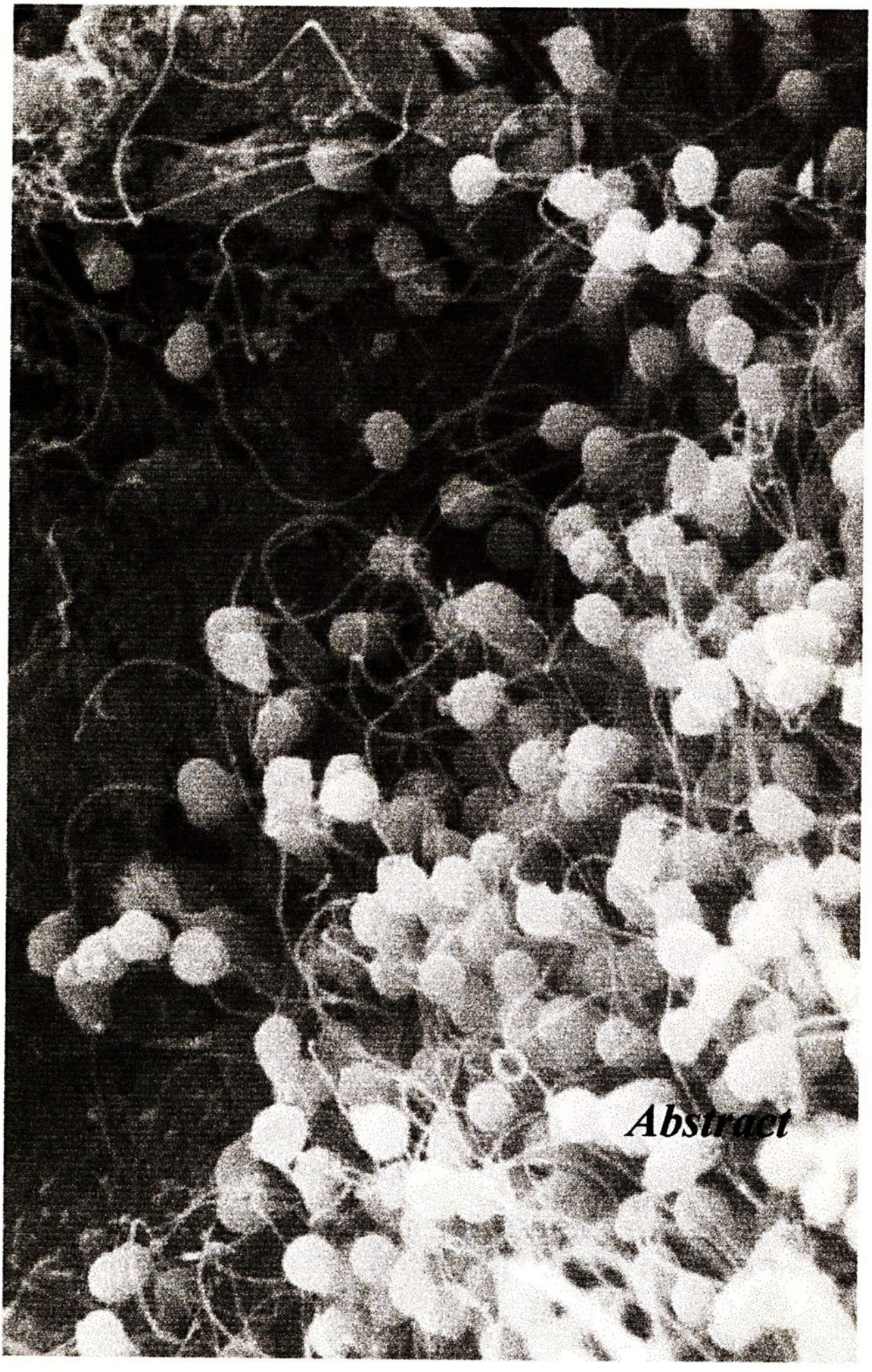
VICENTINI, C.A. Estrutura comparativa da espermatogênese em peixes neotropicais, *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* e *Phalloceros caudimaculatus* (Pisces, Teleostei). Bauru, 2002.102p.Tese (Livre-Docência) - Disciplina de Anatomia Humana e Animal, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi analisar a estrutura comparativa dos testículos, com ênfase ao processo espermatogênico em três espécies de teleósteos neotropicais: *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* e *Phalloceros caudimaculatus*, no período de um ano. Para tanto, foram utilizadas metodologias convencionais para estudos de microscopia de luz (ML), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Fragmentos de testículos foram coletados das três espécies obtidas, em afluentes do rio Tiête, SP, Brasil. Os tecidos após fixação, foram processados segundo rotina de ML e/ou MEV e MET. Foi verificado que a organização das células germinativas dos túbulos seminíferos em *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* correspondem ao padrão espermatogonial irrestrito referente aos testículos de peixes. O ciclo reprodutivo anual destas espécies apresenta quatro fases ou períodos: repouso, maturação, maduro e esgotado, de acordo com a estrutura dos túbulos seminíferos e morfologia geral dos testículos. Por outro lado, o testículo de *Phalloceros caudimaculatus* foi caracterizado como sendo do tipo espermatogonial restrito, não apresentando ciclo testicular anual, com as fases ou períodos anteriormente caracterizados. No entanto, esta espécie mostrou um padrão contínuo do processo de espermatogênese durante o ano, sem

interrupção da espermatocitogênese e espermiação. Todas as espécies estudadas apresentaram padrão cístico para o processo de espermatogênese, com desenvolvimento de diferentes tipos de células germinativas, dentro de cistos. Cada cisto apresentou um tipo principal de célula espermática, tais como: espermatogônias primárias e secundárias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides. O desenvolvimento das células germinativas dentro dos cistos apresentou um processo sincrônico. As células de Sertoli se comportam como "epiteliócitos de sustentação", formando a parede dos cistos espermáticos. As interações entre células de Sertoli de um cisto podem ocorrer por meio de especializações de membrana. Muito embora, a interação das células de Sertoli com as células germinativas, por contato citoplasmático, foi visualizado em *Phalloceros caudimaculatus*. Com relação à forma e estrutura dos espermatozóides, o *Prochilodus scrofa* e *Astyanax scabripinnis* apresentam espermatozóides com cabeças arredondadas, peça intermediária curta e axonema com padrão 9+2 de microtúbulos. Diferentemente, o *Phalloceros caudimaculatus* apresentou espermátides maduras ou espermatozóides com cabeça alongada, localizadas na periferia do cisto germinativo. O acrossoma não foi observado nas três espécies estudadas.

Palavras-chave: Espermatogênese, Estrutura comparativa, Peixes neotropicais, *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis*, *Phalloceros caudimaculatus*.



Abstract

VICENTINI, C.A. Comparative structure of the spermatogenesis in neotropical fishes, *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* and *Phalloceros caudimaculatus* (Pisces, Teleostei). Bauru, 2002.102p.Tese (Livre-Docência) - Disciplina de Anatomia Humana e Animal, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The target of this study was to analyze the comparative structure of the testes regarding to the spermatogenic process in three species of neotropical teleosts: *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* and *Phalloceros caudimaculatus* along the year. For this purpose, conventional methodologies to studies at light microscopy (LM), scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscopy (TEM) were used. Testicular fragments were collected from the three species obtained from the Tietê river, SP, Brazil. The tissues, after adequate fixation, were processed for LM and/or SEM and TEM routines respectively. It was verified that germ cell organization of the seminiferous tubules in *Prochilodus scrofa* and *Astyanax scabripinnis* belonged to the unrestricted spermatogonial pattern of fish testis. The rithymic annual reproductive cycles in these species comprised four periods, as follow: resting, maturation (proliferative phase), mature and quiescent phases, according to the seminiferous tubule structure and general morphology of the testes. On the other hand, the testis of *Phalloceros caudimaculatus* was characterized as restricted spermatogonial testis, and did not present an annual testicular cycle, with the phases later characterized. Although, this fish showed a continuous pattern of spermatogenesis process during the year without interruption

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

of the spermatocytogenesis and spermiation. All the fishes studied had a cystic pattern of the spermatogenesis process with development of the different types of germ cells located inside cysts. Each cyst concerned each main spermatic cell, such as: spermatogonias primary and secondary, spermatocytes, spermatids and spermatozoa. The germ cells development into the cysts was a synchronous process. Sertoli cells acted as "sustentans epitheliocytes", forming the wall of the spermatic cysts. Cell interactions by the plasmalemas between Sertoli to Sertoli cells in the cysts may occur. Nevertheless, Sertoli cells only interacted with germ cells by cell to cell cytoplasm contact in *Phalloceros caudimaculatus*. Concerning to spermatozoa shape and structure, *Prochilodus scrofa* and *Astyanax scabripinnis* showed spermatozoa with spherical heads, small midpieces and axonemas with 9+2 pattern of microtubules. Differently, *Phalloceros caudimaculatus* showed mature spermatids or spermatozoa with an elongated head located at the periphery of the cyst. Acrosoma had been usually absent in the three species studied.

Key words: Spermatogenesis, Comparative structure, Neotropical fishes, *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis*, *Phalloceros caudimaculatus*.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
11 12 13 14 15 16 17 18