

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE ESPERMIAÇÃO
EM MACHOS DE PIAU, *Leporinus macrocephalus*,
HORMONALMENTE INDUZIDOS À REPRODUÇÃO**

MARIO ESTEBAN MUÑOZ GUTIÉRREZ

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini
Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Aquicultura do
CAUNESP, da Universidade Estadual
Paulista, Campus de Jaboticabal, como
parte dos requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Aquicultura

JABOTICABAL
São Paulo – Brasil
2011

M967e Muñoz Gutiérrez, Mario Esteban
Evolução do processo de espermição em machos de Piau,
Leporinus macrocephalus, hormonalmente induzidos à reprodução/
Mario Esteban Muñoz Gutiérrez. – – Jaboticabal, 2011
129 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2011
Orientador: Carlos Alberto Vicentini
Banca examinadora: Luciene Patrici Papa, João Paulo Mardegan
Issa.
Bibliografia

1. Estrutura testicular. 2. Indução hormonal. 3. *Leporinus
macrocephalus*. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03

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

DEDICATÓRIA

*À minha avó, Isabel, que se
converteu no meu anjo da guarda.*

*À minha avó, Lucrecia, pelas
suas orações e bênçãos.*

*Aos meus pais, Esperanza e
Mario, pela ajuda, compreensão e
pelo seu apoio constante para
concluir com sucesso meus estudos
longe de casa.*

*À minha querida irmã Rocio,
pelas palavras de apoio quando
mais as precisei.*

*À minha namorada Andrea,
sempre com as suas palavras de
carinho que me faziam sentir perto
de casa.*

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

Não há palavras suficientes para expressar meu agradecimento ao Professor Carlos, grande pessoa e mestre. Obrigado pelo apoio, ajuda, conhecimentos, amizade e confiança depositada em mim durante este tempo. Tem sido uma honra e um privilégio ser orientado por uma pessoa que desde sua sala e laboratório me ensinou a andar pelos caminhos da pesquisa.

MUITO OBRIGADO POR TUDO!!!

Agradecimentos

A DEUS, pela oportunidade de conhecer novas experiências e me permitir vencer mais uma etapa da vida.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) – Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de dar continuidade à minha formação profissional.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni, pelo conhecimento transmitido, e pelo entendimento do que a vida está cheia de inconvenientes, e não de problemas.

À Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, pela atenção e colaboração. Lembrarei sempre o seu bom olfato para perceber o cheiro de paper que saía da sala do professor.

Aos docentes do CAUNESP, pelo conhecimento compartilhado.

Aos professores da banca examinadora pelas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP, pelo processamento do material e disponibilidade dos equipamentos.

Ao Laboratório de Reprodução do CAUNESP - Jaboticabal.

Ao Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos da UNESP – Bauru.

Aos meus amigos Patrick, Thiago, Julian, Claudemir, Alex, Fernando, Rafael, Jacky e o Andrés pela acolhida, amizade e ajuda.

A todos os colombianos que residem e residirão em Jaboticabal e Bauru.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram na minha formação e na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“Quanto mais alto estivermos situados, mais humildes devemos ser”.

Marco Túlio Cicerón

	<i>Página</i>
<i>RESUMO</i>	10
<i>ABSTRACT</i>	13
1. <i>INTRODUÇÃO GERAL</i>	16
2. <i>LITERATURA</i>	21
2.1 Estrutura testicular	22
2.2 Espermatogênese em teleósteos	25
2.3 Sistema de ductos eferentes (SDE) em teleósteos	28
2.4 Biologia reprodutiva em peixes teleósteos	29
2.5 Reprodução de peixes reofílicos em cativeiro	31
2.6 Análise seminal	32
2.7 Morfometria testicular	34
3. <i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	36
3.1 Seleção dos reprodutores	37
3.2 Análise morfológica do sistema de ductos eferentes	38
3.3 Indução hormonal	38
3.4 Delineamento experimental	39
3.5 Coletas	39
3.6 Microscopia de luz	42
3.7 Microscopia eletrônica de transmissão	42
3.8 Estudos morfométricos	43
3.9 Análise estatística	44
4. <i>RESULTADOS</i>	45
4.1 Parâmetros biométricos	46
4.2 Índices biológicos	47
4.2.1 Índices gonadossomático	47
4.2.2 Índices hepatossomático e viscerossomático	47
4.3 Estrutura testicular	48
4.3.1 Características anatômicas	48
4.3.2 Características histológicas	49
4.3.3 Células da linhagem espermatogênica	50

4.3.3.1 Espermatogônias primárias	50
4.3.3.2 Espermatogônias secundárias	51
4.3.3.3 Espermatócitos primários	51
4.3.3.4 Espermatócitos secundários	52
4.3.3.5 Espermátides	52
4.3.3.6 Espermatozóides	53
4.3.4 Células de Sertoli	54
4.3.5 Sistema de ductos eferentes	54
4.4 Análise seminal	55
4.5 Análises morfométricas	55
4.5.1 Área do túbulo seminífero	55
4.5.2 Área do lúmen tubular	56
4.5.3 Contagens dos cistos germinativos	57
5. DISCUSSÃO	90
5.1 Parâmetros biométricos	91
5.2 Índices biológicos	92
5.3 Estrutura testicular e espermatogênese	93
5.4 Sistema de ductos eferentes	97
5.5 Parâmetros seminais	98
5.6 Epitélio germinativo	101
6. CONCLUSÕES	109
7. REFERÊNCIAS	111

As espécies reofílicas apresentam, de modo geral, suas gônadas desenvolvidas até estágios avançados de maturação, porém as etapas finais do processo reprodutivo, tais como, a maturação final dos ovócitos, a ovulação, a desova e a liberação de sêmen, somente são atingidas mediante tratamentos hormonais. No entanto, a reprodução induzida de *Leporinus macrocephalus* apresenta algumas particularidades. Mesmo com a aplicação de duas doses de hormônio, os machos de *L. macrocephalus* geralmente liberam uma quantidade muito reduzida de sêmen, que freqüentemente é insuficiente para os procedimentos de reprodução induzida. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a evolução do processo de espermiacção em reprodutores machos de *L. macrocephalus*, submetidos a tratamento hormonal. Para tanto, foram realizados estudos histológicos da estrutura testicular e da via seminífera, com inclusão de tecidos em historesina e coloração com azul de Toluidina. Estudos ultraestruturais das células germinativas foram realizados com processamento do material para rotina de microscopia eletrônica de transmissão. Análise da via seminífera foi também realizada com a injeção de acetato de vinila nos ductos testiculares e posterior análise em microscopia eletrônica de varredura. Para análise do epitélio germinativo ao longo do processo de indução hormonal, as preparações histológicas foram destinadas para estudos morfométricos, com utilização de sistema de análise de imagens. Após o tratamento hormonal foram realizadas análises seminais para verificação do volume total de sêmen liberado, concentração espermática, tempo de ativação e sobrevivência dos espermatozóides. Os estudos morfológicos evidenciaram que a estrutura testicular de *L. macrocephalus* é do tipo tubular anastomosado, espermatogonial irrestrito com espermatogênese do tipo cística. A via seminífera da espécie estudada compreende os túbulos seminíferos anastomosados, o ducto testicular principal e ducto espermático. Os estudos histológicos e ultraestruturais

evidenciaram que a conexão dos túbulos seminíferos ocorre em diferentes segmentos ao longo de todo o ducto testicular principal. Quanto aos índices biológicos analisados e os estudos morfométricos realizados, foi possível evidenciar que a espécie *L. macrocephalus* responde adequadamente ao tratamento hormonal com extrato de hipófise, considerando que ocorreu aumento do índice gonadossomático (IGS) e dilatação dos túbulos seminíferos durante os tratamentos hormonais. A análise seminal após os tratamentos hormonais de *L. macrocephalus* demonstrou um baixo volume de sêmen liberado e uma concentração espermática similar à de outros peixes reofílicos. Em conclusão, as características morfológicas testiculares, a estrutura do sistema de ductos eferentes e o tratamento hormonal utilizado para a reprodução em cativeiro, não estão relacionados com o baixo volume de sêmen liberado pela espécie.

Palavras chave: estrutura testicular, indução hormonal, *L. macrocephalus*, peixe neotropical.

ABSTRACT

Rheophilic species present, in general, their gonads developed to advanced stages of maturation, but the final stages of the reproductive process, such as the final maturation of oocytes, ovulation, spawning, and release of semen, are only achieved with hormonal treatments. However, the induced breeding of *Leporinus macrocephalus* has some peculiarities. Even with the application of two doses of hormone, males of *L. macrocephalus* usually release reduced semen, which is often insufficient for procedures of induced spawning. Thus, the objective of this study was to evaluate the progress of spermiation in males broodstocks of *L. macrocephalus*, undergoing hormonal treatment. For this, were performed histological studies of testicular structure and the seminal pathway with tissue inclusion into historesin and staining with toluidine blue. Ultrastructural studies of the stems cells were performed with material processing for routine of transmission electron microscopy. Analyses of seminal pathway were performed with the injection of vinyl acetate in the testicular ducts and subsequent analysis of scanning electron microscopy. For analysis of the germinal epithelium throughout the hormonal induction process, the histological preparations were destined for morphometric studies using an image analysis system. After hormone treatment seminal analysis was performed to verify the volume total release of semen, sperm concentration, time activation and survival of spermatozoa. Morphological studies evidence that the testicular structure of *L. macrocephalus* is anastomosed tubular type, espermatogonial unrestricted with a spermatogenesis of cystic type. The seminal pathway of this species comprises the seminiferous tubules anastomosing, the main testicular duct and spermatic duct. The histologic and ultrastructural studies showed that the connection of the seminiferous tubules occurs in different segments throughout the testicular main duct. Concerning to the biological index analyzed and the studies morphometrics, we found that species

L. macrocephalus respond adequately to the pituitary hormonal treatment, considering there increase in the gonadosomatic index (GSI) and dilation of seminiferous tubules during hormone treatment. The semen analysis after hormonal treatments of *L. macrocephalus* showed a low volume of semen released and a sperm concentration similar to other rheophilic fishes. In conclusion, the testicular morphology characteristics, the structure of the efferent duct system and the hormonal treatment used to captive breeding are not related with the low volume of semen released by the species.

Key words: testicular structure, hormonal induction, *L. macrocephalus*, Neotropical fish.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O domínio biogeográfico Neotropical, que inclui a América do Sul, América Central e o Caribe, possui a ictiofauna dulciaquícola mais diversa e rica do mundo. De acordo com Reis *et al.* (2003), das quase 12.000 espécies de peixes de água doce estimadas para o planeta, aproximadamente 6.000 são encontradas nesta faixa Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas, e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente.

Segundo Buckup *et al.* (2007), o Brasil se apresenta como o país com a maior diversidade de peixes da região, já que aproximadamente 2.500 das 4.475 espécies encontram-se registradas e catalogadas nas bacias hidrográficas de todo o país. Esta característica tem despertado um grande interesse tanto nacional como internacional, não só da comunidade científica, como também de empresas ligadas à piscicultura, estimulando as pesquisas relacionadas à manutenção e desenvolvimento, em cativeiro, de pacotes tecnológicos das espécies com valor comercial.

Nos dias atuais e num sentido mais amplo, usa-se o termo aquicultura, para designar a produção de organismos com habitat predominantemente aquático, em cativeiro, em qualquer um dos seus estágios de desenvolvimento (Valenti, 2002). Segundo Garutti (2003), a piscicultura se apresenta como uma modalidade de aquicultura que se pode transformar em uma excelente atividade econômica rentável. De acordo com Veríssimo-Silveira (2003), o Brasil possui um dos maiores potenciais do mundo para o desenvolvimento desta atividade, devido particularmente ao seu clima, diversidade de espécies, quantidade de água, tipo do solo e facilidade de acesso aos locais de produção.

Junto às espécies exóticas (tilápia, carpas e trutas) introduzidas para serem cultivadas no país, o Brasil apresenta um grande número de espécies amazônicas e do Pantanal, que estão sendo aproveitadas para o cultivo (FAO, 2007). Dentre as principais espécies nativas usadas na aquicultura, estão presentes: o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pirapitanga (*Piaractus brachypomus*), o curimbatá (*Prochilodus lineatus*), o matrinxã (*Brycon amazonicus*) e o piau (*Leporinus macrocephalus*), sendo esta última a quinta espécie mais produzida em todo o país (FAO, 2007).

O gênero *Leporinus*, estabelecido por Spix em 1829, é o maior da família Anostomidae, tanto em número de espécies (mais de 92 descritas) quanto em número de indivíduos, nas bacias fluviais onde ocorre (Garavello e Britski, 1988; Buckup *et al.*, 2007). Constitui um grupo natural de ampla distribuição ocorrendo desde o Rio Atrato no Noroeste da Colômbia, até a parte central do Sul da Argentina (Sidlauskas e Vari, 2008).

As espécies do gênero *Leporinus* são onívoras, predominantemente herbívoras e alimentam-se de algas filamentosas, macrófitas aquáticas (raízes e folhas), frutos de plantas ribeirinhas, vermes, larvas de insetos e zooplâncton. Em cativeiro, adaptam-se muito bem às rações artificiais, tornando-se atrativas para a piscicultura intensiva (Ferreira e Godinho, 1990; Castagnolli, 1992). Popularmente conhecido como Piau, Piavuçu e Piaussu, *L. macrocephalus* provem das bacias dos rios Paraná e Paraguai no Pantanal Matogrossense, e é uma das maiores espécies do gênero, podendo alcançar 600 mm de comprimento total e 6 kg de peso (Reynalte-Tataje *et al.*, 2001; 2002).

A espécie *L. macrocephalus* apresenta dimorfismo sexual, sendo possível, em qualquer época do ano, distinguir os machos das fêmeas, através da forma do abdômen: enquanto os machos são afilados, as fêmeas são abauladas. Além disso, as fêmeas são sempre maiores que os machos da mesma idade, pois crescem mais depressa. Em cativeiro, os machos atingem a maturidade aos 12 meses e as fêmeas aos 14 meses de engorda. Quanto ao hábito reprodutivo, os peixes do gênero *Leporinus* são reofílicos e se reproduzem uma vez por ano, na época da cheia dos rios (outubro a março). Desovam em lagoas e áreas marginais e apresentam fecundação externa (Reynalte-Tataje *et al.*, 2002).

Assim, como a maioria das espécies de peixes migradores nativos, o *L. macrocephalus* desova várias vezes na vida, sendo este um processo que ocorre em intervalos que se repetem. Nestas espécies, os ovócitos normalmente maturam e são liberados em um único lote (desovadores totais). O processo de reprodução natural direciona a produção dos jovens no período do ano mais favorável para a sobrevivência (estação das cheias), quando existe alimento abundante para um crescimento rápido e maior proteção contra predadores (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). Não obstante, em cativeiro, as espécies reofílicas apresentam, de modo geral, suas gônadas desenvolvidas até estágios avançados de maturação, porém as etapas finais do processo reprodutivo, tais como, a maturação final dos ovócitos, a ovulação, a desova e a liberação de sêmen, somente são atingidas mediante tratamentos hormonais (Sato *et al.*, 2000; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

No entanto, a reprodução induzida do *L. macrocephalus* apresenta algumas particularidades. É sabido que a reprodução do piaui é muitas vezes desfavorecida pela dificuldade de obtenção de sêmen (Amaral, 1999; Moraes, 2004). Normalmente, em

procedimentos de reprodução induzida, mesmo recebendo duas doses de hormônio, os machos de piau liberam quantidade muito reduzida de sêmen que, freqüentemente, é insuficiente (Streit *et al.*, 2003). Muitas vezes, os machos precisam ser mortos para que os testículos sejam comprimidos e possam ser obtidas algumas pequenas gotas de sêmen, trazendo prejuízos principalmente quando os mesmos são geneticamente selecionados (Ribeiro e Godinho, 2003).

Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a evolução do processo de espermição em reprodutores machos de *L. macrocephalus*, submetidos a tratamento hormonal, com o propósito de obter informações básicas que servirão de embasamento e direcionamento, para futuras tentativas de aprimorar o desempenho reprodutivo de machos desta espécie, em procedimentos de reprodução induzida. Assim sendo, os seguintes estudos foram realizados:

- a) Análise morfológica da estrutura testicular e da via seminífera,
- b) Avaliação dos índices biológicos (gonadossomático, hepatossomático e viscerossomático) ao longo do processo de indução hormonal,
- c) Descrição e morfometria do epitélio germinativo ao longo do processo de indução hormonal mediante a avaliação histológica,
- d) Quantificação do efeito hormonal na freqüência de cistos germinativos nos túbulos seminíferos,
- e) Análise seminal após o tratamento hormonal.

2. LITERATURA

2.1 Estrutura testicular

Os peixes teleósteos, como grupo, alcançaram sucesso em ambientes distintos por apresentarem várias estratégias reprodutivas, o que permitiram sua adaptação a ambientes nos quais tanto as condições bióticas como abióticas, variam amplamente no espaço e no tempo (Vazzoler, 1996; Nóbrega *et al.*, 2009). O resultado dessa grande diversidade reprodutiva é a presença de diferentes tipos de morfologias no sistema reprodutivo e nas estruturas gonadais, principalmente em termos de testículos (Billard, 1986; Nóbrega, 2003; Mazzoldi *et al.*, 2007).

Nas espécies com fecundação externa, os testículos são órgãos pares e alongados, situados no celoma, caudalmente aos rins, dorsalmente ao canal alimentar e sustentados por uma camada fina de peritônio, o mesórquio (Selman e Wallace, 1986; Pudney, 1995; Le Gac e Loir, 1999). São individualizados em toda a sua extensão unindo-se apenas na extremidade caudal, para formar o ducto espermático que se abre na papila urogenital (Verissimo-Silevira, 2003). Podem variar de simples bolsas alongadas a órgãos foliáceos com função predominantemente espermatogênica, contendo regiões diferenciadas com função secretora ou armazenadora de sêmen (Loir *et al.*, 1989).

A superfície externa das gônadas é lisa, sendo os seus volumes, formatos e colorações variáveis com o desenvolvimento gonadal (Alexandrino *et al.*, 1985). Microscopicamente são envolvidos por um tecido conjuntivo, a túnica albugínea, que emite projeções para o interior do órgão, delimitando os lóbulos ou túbulos seminíferos, que revestem e sustentam o tecido epitelial germinativo, cuja espessura varia durante o ciclo reprodutivo (Grier, 1981; Amaral, 1999; Verissimo-Silevira, 2003; Batlouni *et al.*, 2006).

Similar aos outros vertebrados, a função dos testículos em teleósteos pode ser resumida em três aspectos principais: 1) a formação de espermatozóides durante a espermatogênese, 2) envio do sêmen ao sistema de ductos eferentes durante a espermição, e 3) a secreção de hormônios sexuais (Pudney, 1995).

Em vertebrados, os testículos estão compostos de dois compartimentos: o compartimento germinativo e o intersticial. O primeiro é formado pelas células germinativas (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides) e pelas células somáticas de Sertoli, unidas por complexos juncionais e apoiadas na lamina basal, que delinea o compartimento junto às células peritubulares mióides; o segundo compartimento, o intersticial, é formado pelas células esteroideogênicas de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo (Grier, 1981; Parenti e Grier, 2004; Kerr *et al.*, 2006; Nóbrega *et al.*, 2009; Grier e Uribe-Aranzábal, 2009; Schulz *et al.*, 2009).

Nos Teleostei, o epitélio germinativo organiza-se em cistos formados por grupos de células germinativas em desenvolvimento sincrônico, envoltas pelas células de Sertoli (Grier, 1981). Devido a essa organização, o epitélio germinativo passa por várias alterações morfológicas ao longo do ciclo reprodutivo. Assim, é possível reconhecer dois tipos de epitélio: contínuo e descontínuo (Grier e Taylor, 1998; Grier e Uribe-Aranzábal 2009). O epitélio germinativo contínuo é constituído por uma população contínua de células de Sertoli e células germinativas que se estendem ao longo de todo o comprimento dos túbulos ou lóbulos. Por outro lado, o epitélio germinativo descontínuo é caracterizado pela perda das células germinativas, quando os espermatozóides são expelidos dos cistos; porém, como isto não ocorre uniformemente, na parede do lóbulo ou túbulo alterna-se, um epitélio

formado apenas por células de Sertoli e um com regiões contendo o epitélio germinativo típico (células de Sertoli associadas a células germinativas).

Finalmente, de acordo com os últimos relatos sobre a estrutura testicular feitas por Parenti e Grier (2004) e Grier e Uribe-Aranzábal (2009), os testículos de teleósteos foram classificados em três tipos, dependendo da forma e organização do compartimento germinativo:

- 1) *Testículo tubular anastomosado*: é caracterizado pela formação de alças e túbulos que se interconectam e se anastomosam, desde a periferia até a região do ducto testicular. Neste, as espermatogônias encontram-se distribuídas ao longo dos túbulos seminíferos, tendo um padrão espermatogonial irrestrito. Este tipo de testículo esta presente nos teleósteos mais basais, como por exemplo, nos Characiformes (Vicentini *et al.*, 2001) e Siluriformes (Batlouni *et al.*, 2006) .
- 2) *Testículo lobular espermatogonial irrestrito*: é encontrado em neoteleósteos, exceto em Atherinomorpha. Neste tipo de testículo, o compartimento germinativo, em forma digitiforme, se estende até a periferia do testículo terminando em um fundo cego formando um lóbulo. Caracteriza-se pela distribuição das espermatogônias ao longo dos lóbulos. Durante a espermição, os espermatozóides são liberados dentro do lúmen lobular. Este tipo testicular foi descrito para *Enneacanthus gloriosus*, *Lepomis macrochirus*, *Micropterus salmoides* e *Promoxis nigromaculatus*, entre outros (Grier, 1980a).
- 3) *Testículo lobular espermatogonial restrito*: característico dos Atherinomorpha. Neste tipo testicular, similar ao anterior, o compartimento germinativo termina em

fundo cego na periferia testicular, porém as espermatogônias não estão distribuídas ao longo das paredes lobulares e sim, restritas à periferia dos lóbulos. Durante a espermatogênese, os cistos de células germinativas em diferenciação são deslocados ao longo dos lóbulos e ao final da espermiogênese, os cistos se abrem e os espermatozóides são liberados nos ductos eferentes. Como exemplo, este tipo testicular ocorre em espécies de poecilídeos, como *Poecilia latipina* (Grier *et al.*, 1980b), *Poecilia reticulata* (Billard, 1984), *Gambusia affinis holbrooki* (Fraile *et al.*, 1992) e *Phalloceros caudimaculatus* (Vicentini *et al.*, 2010).

2.2 Espermatogênese em teleósteos

A espermatogênese é um processo biológico complexo de transformação celular, que produz células germinativas masculinas haplóides a partir de uma célula tronco espermatogonial diplóide (Feng *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2009; Nóbrega *et al.*, 2009; Schulz, *et al.*, 2009; Hogarth e Griswold, 2010).

Em geral, durante a espermatogênese, as espermatogônias estão associadas às células somáticas de Sertoli, no compartimento germinativo (Akama *et al.*, 2002). Inicialmente, os processos citoplasmáticos das células de Sertoli envolvem uma espermatogônia primária ou do tipo A. Após divisões mitóticas das espermatogônias, as células de Sertoli envolvem clones isogênicos de espermatogônias secundárias ou tipo B, encerrando-as dentro de cistos, ou espermatocistos. Os clones das células permaneceram interconectados pelas pontes citoplasmáticas, desenvolvendo-se sincronicamente até o final da espermiogênese, quando os cistos abrem-se e os espermatozóides são liberados no

compartimento luminal (Grier, 1981; Billard, 1986; Pudney, 1995; Leal *et al.*, 2009; Batlouni *et al.*, 2009; Grier e Uribe-Aranzábal, 2009; Shulz *et al.*, 2009).

Segundo Mattei *et al.* (1993), existem dois tipos de espermatogênese, do tipo cístico e semi-cístico. O primeiro tipo tem ocorrência completa da espermatogênese no cisto; enquanto que no segundo tipo, a abertura dos cistos ocorre antes do término da espermiogênese, liberando as espermatídes no lúmen para que terminem a sua maturação no ducto testicular. Este último tipo é observado em espécies da família Callichthyidae, como é o caso de *Callichthys callichthys*, *Corydoras spp.* e *Hoplosternum littorale* (Mazzoldi *et al.*, 2007).

Por outro lado, similar aos mamíferos, a espermatogênese em peixes está dividida em três fases: *proliferação* ou *espermatoγονial*, onde as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; *meiótica* ou *espermatoцитária*, onde o material genético é duplicado, recombinação e segregado; e *diferenciação* ou *espermiogênica*, onde as espermatídes sofrem drásticas mudanças morfo-funcionais, como a condensação nuclear e a formação do flagelo, dando origem aos espermatozóides que são estruturalmente equipados para atingir e fertilizar o ovócito (Schulz e Miura, 2002; Nóbrega *et al.*, 2009).

No início da espermatogênese, durante a fase de proliferação, as espermatogônias primárias diplóides, ou do tipo A, sofrem constantes divisões mitóticas, incrementando o número de células germinais, com finalidade espermatogênica (Schulz e Miura, 2002). Segundo Lacerda *et al.* (2006), a divisão mitótica da espermatogônia tipo A dentro do cisto, origina um grupo de células denominadas espermatogônias secundárias ou do tipo B que,

depois de um número espécie-específico de divisões mitóticas, diferenciam-se em espermatócitos primários, iniciando a fase meiótica ou espermatocitária.

Durante a fase espermatocitária, os espermatócitos primários entram em uma sequência de dois ciclos celulares especializados, a meiose I e II. Na meiose I- reducional, os cromossomos homólogos são separados dentro de espermatócitos secundários; e na meiose II – equacional, as cromátides irmãs são separadas, resultando em quatro células haplóides (espermátides), que possuem uma cópia de cada cromossomo (Schulz *et al.*, 2009). Cabe destacar que um dos principais objetivos da meiose é gerar diversidade genética através de dois eventos, a recombinação gênica (crossing-over) e a segregação dos cromossomos homólogos (Alberts *et al.*, 2008).

Durante a última fase, ocorre a espermiogênese, que consiste em uma série de transformações morfológicas, as quais conduzem à diferenciação de espermátides em espermatozóides (Shulz *et al.*, 2009). As mudanças incluem condensação nuclear, eliminação de organelas e citoplasma, formação do flagelo, e rearranjo das organelas celulares ao longo do citoplasma espermatozoidal (Grier e Uribe-Aranzábal, 2009). As estruturas dos espermatozóides variam consideravelmente entre as espécies de teleósteos e podem ser utilizadas para resolver problemas taxonômicos e auxiliar ou, até mesmo, estabelecer filogenias entre as espécies (Veríssimo-Silveira, 2007).

No final da espermiogênese, quando as pontes intracelulares rompem-se e os espermatozóides são visualizados, os complexos juncionais entre as células de Sertoli sofrem uma remodelação dinâmica, que termina com a abertura dos cistos e liberação dos espermatozóides para o lúmen tubular (Batlouni *et al.*, 2005).

Em algumas espécies, embora os espermatozóides tenham completado a espermiogênese, eles ainda não são capazes de fertilizar os ovócitos. A capacidade de fecundar e a aquisição de motilidade ocorrem através da passagem pelo sistema de ductos eferentes, mais especificamente no ducto espermático, envolvendo mudanças de natureza fisiológica, mas não morfológica (Miura e Miura, 2003).

2.3 Sistema de ductos eferentes (SDE) em teleósteos

O sistema de ductos eferentes é definido como o sistema transportador dos espermatozóides desde o interior dos testículos até o ambiente externo (Lahnsteiner e Patzner, 2009). Tem como função drenar o sêmen, armazenar, nutrir, reabsorver os espermatozóides e secretar o fluido seminal, em espécies que não possuem glândulas acessórias seminais (Lahnsteiner *et al.*, 1993a; Walter *et al.*, 2005).

Em teleósteos, o SDE está constituído pelos ductos eferentes testiculares, ductos testiculares principais e ductos espermáticos (Grier, 1980a; Lahnsteiner *et al.*, 1993a; 1994; Lahnsteiner, 2003). De acordo com Lahnsteiner e Patzner (2009), os ductos eferentes testiculares representam um estágio transicional entre os ductos seminíferos e o ducto testicular principal. Só em espécies das famílias Salmonidae (*Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus alpinus*, *Thymallus thymallus* e *Coregonus sp.*) e Esocidae (*Esox lucius*) os ductos eferentes têm sido descritos (Lahnsteiner *et al.*, 1993a, 1993b). Em outras espécies estudadas de teleósteos, o ducto eferente testicular é ausente e os túbulos seminíferos esvaziam seu conteúdo diretamente no ducto testicular principal. Este é o caso de *Alburnus alburnus*, *Leuciscus cephalus* e *Vimba vimba*, pertencentes à família Cyprinidae (Lahnsteiner *et al.*, 1994), *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus*, *Sparisoma cretense*, *Synodon*

sauros, *Trachinus draco*, *Uranuscopus scaber*, *Thalassoma pavo* (Lahnsteiner, 2003) e *Prochilodus scrofa* pertencente à família Prochilodontidae (Vicentini *et al.*, 2001).

Em todos os casos, ao final do processo de espermiogênese, os espermatozóides liberados na luz dos túbulos seminíferos confluem para o interior da luz do ducto testicular principal e deste, para o ducto espermático que se abre na papila urogenital liberando o seu conteúdo no exterior (Lahnsteiner e Patzner, 2009). Por outro lado, análises histológicas dos ductos testiculares principais e ductos espermáticos têm revelado que os mesmos estão constituídos de três camadas: externamente revestidos de peritônio; de uma camada média de tecido conjuntivo orientado transversalmente contendo células de músculo liso; e internamente de uma camada epitelial (Lahnsteiner e Patzner, 2009). Cabe destacar, que as características do epitélio de revestimento podem variar durante o ciclo reprodutivo, como é o caso de *Leuciscus cephalus*, pertencente da família Cyprinidae, onde o epitélio de revestimento mudou de escamoso cuboidal durante a fase de pré-desova e pós-desova, a colunar durante a fase de desova (Walter *et al.*, 2005).

2.4 Biologia reprodutiva em peixes teleósteos

Em geral, o ciclo reprodutivo em vertebrados está regulado pelo eixo hipotálamo–hipófise–gônada (HHG), também chamado eixo reprodutivo. Neste eixo, as gonadotropinas hipofisárias, o hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), são os principais agentes no controle endócrino da reprodução (Schally, 1978; Huhtaniemi, 1999; Rolland *et al.*, 2008; Cabrita *et al.*, 2009).

No eixo reprodutivo, os fatores ambientais estimulam o hipotálamo por meio dos órgãos sensoriais ligados ao sistema nervoso. Se a intensidade dos estímulos for suficiente

para eliminar o efeito inibitório da dopamina, os neurônios específicos do hipotálamo sintetizam o decapeptídeo GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas), o qual induz à produção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) pela hipófise anterior. Para o seu transporte, os dois hormônios são liberados na corrente sanguínea, para atuar na gônada, onde estimulam a síntese de hormônios esteróides (andrógenos, estrógenos e progesteronas), que são os últimos efetores no desenvolvimento gonadal. No testículo, o LH induz a síntese de testosterona pelas células de Leydig, o qual influenciará negativamente (feedback negativo) na liberação de hormônio no hipotálamo e na hipófise; enquanto que o FSH exerce funções mais complexas, também estimulando a produção de andrógenos nas células de Leydig, e regulando a atividade das células de Sertoli durante a espermatogênese. O hormônio folículo estimulante (FSH) desempenha um importante papel regulador nos estádios iniciais da espermatogênese, durante o início da proliferação espermatogonial, enquanto que o LH está principalmente envolvido no final do estágio de maturação. Ao serem estimuladas, as células de Leydig produzem o andrógeno 11 keto-testosterona (11 KT) que estimula a espermatogônia a dividir-se em espermátócitos no interior dos cistos germinativos formados pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli. O FSH atua nas células de Sertoli regulando processos de espermatogênese e é responsável também, pelo início do processo da liberação dos espermatozóides no lúmen testicular (Nakamura *et al.*, 2003; Swamson *et al.*, 2003; Schulz e Miura, 2002; Rolland *et al.*, 2008; Cabrita *et al.*, 2009; Rudolf, 2009; Schulz *et al.*, 2009; Mylonas *et al.*, 2010).

2.5 Reprodução de peixes reofílicos em cativeiro

O número de espécies aquáticas atualmente em “domesticação” tem crescido rapidamente, devido ao desenvolvimento da aquicultura comercial (Duarte *et al.*, 2007).

Um dos principais pré-requisitos para “domesticar” e estabelecer uma indústria aquícola sustentável de uma espécie é a capacidade de controlar os seus processos reprodutivos em cativeiro e adquirir uma alta qualidade da sua descendência (ovócitos e espermatozóides) (Mylonas *et al.*, 2010).

Os aquícultores brasileiros têm voltado sua atenção para reproduzir e obter descendência de ótima qualidade de espécies nativas migradoras, pelo seu elevado valor comercial no mercado nacional (Carolsfeld *et al.*, 2003; Godinho, 2007). Estas espécies, também conhecidas como reofílicas, são aquelas que realizam migrações ao longo dos rios durante a sua época de desova (Viveiros e Godinho, 2009). Em cativeiro, os peixes reofílicos precisam invariavelmente de intervenção humana para a sua reprodução, já que apresentam deficiências orgânicas e é indispensável o uso da indução hormonal para a obtenção de juvenis.

Os hormônios foram usados pela primeira vez na aquícultura brasileira em 1930, quando Von Ihering injetou hipófise de peixe homogeneizada para induzir à maturação final e desova de peixes migradores (Donaldson, 2000). Essa técnica continua sendo uma das alternativas mais utilizadas para induzir a reprodução de peixes reofílicos no mundo, sendo conhecida como “hipofisação” (Streit *et al.*, 2003; Zaniboni Filho e Weingartner, 2007).

Baseado na dificuldade dos peixes reofílicos em cativeiro obterem uma espermiacção completa e maturação dos ovócitos, devido à pouca quantidade de LH liberado pela hipófise, manipulações das funções reprodutivas têm sido realizadas com o uso de preparações exógenas de LH, que atuam diretamente em nível gonadal; e mais

recentemente na utilização de GnRHa, que libera a reserva de LH endógeno pela hipófise, atuando em nível da gônada para induzir esteroidogênese e os processos de maturação ovocitária e espermição (Mylonas *et al.*, 2010).

As preparações do hormônio luteinizante para seu uso na hipofiseção incluem estratos homogeneizados e purificados de hipófise de peixes maduros, durante a sua época reprodutiva (comumente Carpa e alguns Salmonídeos), que contém altos níveis de LH (Zohar e Mylonas, 2001). Focando-se nos machos, o papel da hipofiseção é principalmente incrementar a produção de fluido seminal, facilitando a espermição e de estimular a conclusão da espermatogênese (espermiogênese) (Pillay e Kutty, 2005; Zaniboni Filho e Weingartner, 2007; Cabrita *et al.*, 2009; Mylonas *et al.*, 2010).

2.6 Análise Seminal

A qualidade dos gametas na natureza, ou em cativeiro, é influenciada por vários fatores que são altamente variáveis. Por esta razão, as condições dos gametas têm recebido grande atenção, e muitos estudos têm caracterizado o efeito de fatores específicos na qualidade dos ovócitos e sêmen de espécies ícticas (Bobe e Labbé, 2010).

O uso de gametas de alta qualidade, obtido de reprodutores em cativeiro, é de grande importância para assegurar a produção de uma prole valiosa. A indústria piscícola mundial tem estado mais atenta para a qualidade de ovócitos e larvas, apesar da qualidade do sêmen também interfere na produção de larvas saudáveis. No entanto, em fazendas comerciais, o sêmen é freqüentemente inadequado em termos de quantidade e qualidade, e nem sempre ocorrem fertilizações satisfatórias nos procedimentos de inseminação artificial, comumente usados na aquicultura (Rurangwa *et al.*, 2004).

Na produção de peixes comerciais a avaliação da qualidade do sêmen é um fator importante para incrementar a eficiência da fertilização (Lahnsteiner e Patzner, 1998; Gholami *et al.*, 2010). Lahnsteiner (2000) ressaltou a importância de conhecer as características morfológicas e funcionais dos espermatozóides, para o estudo básico da biologia reprodutiva e para a produção em cativeiro de qualquer espécie íctica, assim como, para o desenvolvimento de técnicas dirigidas à conservação de espécies nativas.

Os critérios utilizados para a avaliação do sêmen de peixes têm-se baseado no volume seminal, concentração espermática, exames da motilidade (tempo de ativação), e porcentagem de espermatozóides vivos e mortos (Kavamoto *et al.*, 1998). O volume seminal pode ser medido usando ferramentas como pipetas ou tubos graduados para colheita de sêmen. O volume se expressa em mililitro (ml), e o valor aferido será utilizado para cálculos posteriores, como o número de espermatozóides na amostra ou a quantidade de espermatozóides obtidos por quilograma de reprodutor (Cruz – Casallas *et al.*, 2004).

Entre as medidas mais importantes avaliadas no sêmen, destaca-se a concentração espermática, a qual é uma variação espécie-específica e consiste na determinação do número de espermatozóides por mililitro de sêmen liberado. Estes resultados ajudam a maximizar o aproveitamento do material fecundante, obtendo-se assim, melhores resultados na fertilização (Rurangwa *et al.*, 2004).

O teste de tempo de ativação trata-se do tempo transcorrido desde o momento em que se adiciona ao sêmen uma solução ativadora (p.e. água ou bicarbonato a 1%), até a verificação de ausência total da motilidade dos espermatozóides; tais medições podem ser realizadas na verificação total ou apenas de 50 % dos espermatozóides na amostra (Hilbig

et al., 2008). Este parâmetro de qualidade, geralmente coincide com o período fértil do sêmen (Viveiros e Godinho, 2009).

Finalmente, o teste de porcentagem de espermatozóides vivos e mortos, também conhecido como sobrevivência e viabilidade espermática, determina a porcentagem de células espermáticas mortas ou com graves danos na integridade da sua membrana celular. Para o cálculo é utilizado o método da coloração diferencial, usando uma solução de eosina e como corante de contraste a nigrosina, baseada no fato de que os espermatozóides mortos são permeáveis aos corantes e assim estes são corados no micropreparado (Swanson e Bearden, 1951).

2.7 Morfometria testicular

A pesquisa histomorfométrica é uma abordagem adequada para o melhor entendimento dos processos espermatogênicos e das funções testiculares (Schulz, *et al.*, 2009). Tal avaliação permite estimar a eficiência espermatogênica para cada espécie, por meio, por exemplo, do comprimento dos túbulos seminíferos, frequência de cistos germinativos, gerações espermatogoniais, e porcentagem de células mortas, dentre outros fatores (Schulz, *et al.*, 2005).

A utilização da morfometria, tanto em situação experimental ou não, está permitindo uma melhor compreensão da histofisiologia e cinética das células germinativas e das células de Sertoli nos teleósteos, constituindo-se atualmente num valioso instrumento na interpretação das gônadas de peixes (Nóbrega, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção dos reprodutores

Para o desenvolvimento deste trabalho foram inicialmente mantidos 57 exemplares adultos (34 machos e 23 fêmeas) de *Leporinus macrocephalus*, em um viveiro escavado de 200m² com 1,5m de profundidade, e arraçados seis dias da semana, em duas porções, às 08h00min e às 17h00min, com ração comercial extrusada (para peixes onívoros com 28% de proteína bruta), totalizando 3% da biomassa do plantel dia. No dia 20 de março de 2009, foram computados os dados de comprimento e peso total dos 34 machos. Estes dados foram utilizados posteriormente para determinar a variação no tamanho e o ganho de peso diário até o momento da indução hormonal.

Na época de reprodução, os animais foram avaliados periodicamente quanto ao seu status reprodutivo. No momento que os machos apresentaram as características de maturação gonadal, descritas por Woynarovich e Horváth (1983), com a liberação de gotas de esperma espesso ao se comprimir o abdômen levemente, no sentido crânio-caudal, deu-se início ao experimento.

Após a seleção, 20 machos foram transportados ao Laboratório de Reprodução do CAUNESP onde foram pesados para se determinar a dose hormonal a ser utilizada, e acondicionados em tanques de fibra de vidro de 1.000 litros, com sistema aberto de água. Cada tanque continha uma coluna de água de 80 cm, com temperatura média de 25,6±0,60 °C, pH de 8,17±0,15 e oxigênio dissolvido de 7,82±0,26 mg·L⁻¹. Os registros foram aferidos com ajuda de aparelhos adequados da Yellow Spring Incorporation modelo YSI 55 e YSI 63.

3.2 Análise morfológica do sistema de ductos eferentes

Para o estudo mesoscópico do sistema de ductos eferentes de *L. macrocephalus*, foram utilizados seis animais sem nenhum tratamento hormonal, os quais foram anestesiados e eutanaziados por exposição a overdose de benzocaína, e subseqüentemente necropsiados para exposição e remoção dos testículos. O ducto testicular principal e ducto espermático foram perfundidos com uma seringa, contendo acetato de vinila em uma solução de acetona a 20%. Os testículos foram imersos em ácido clorídrico a 20% para corrosão e confecção dos moldes da via seminífera, de acordo com a metodologia utilizada por Duran *et al.* (1992) e Vicentini *et al.* (2001).

Os moldes foram analisados e fotodocumentados com auxílio de uma câmera Nikon D40, acoplada a uma lente Sigma Ex 105 mm 1:2:8 DG MACRO, e posteriormente submetido à rotina de microscopia eletrônica de varredura. O material foi processado e metalizado com uma mistura de ouro coloidal (Denton vacuum Desk II) e a seguir analisado e documentado fotograficamente com auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5410), junto ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP, Campus de Jaboticabal.

3.3 Indução hormonal

A indução à reprodução foi efetuada com uso de extrato de hipófise de carpa comum *Cyprinus carpio* (HC) (obtida por importação, atendendo as normas estabelecidas pela Vigilância Sanitária) macerada e diluída em solução fisiológica a 0,9%. As aplicações foram feitas na base da nadadeira peitoral com seringas de insulina, sendo a primeira dose de 1,5 mg (HC)/Kg e a segunda de 2,0 mg (HC)/Kg, com intervalo de 12 horas entre elas.

3.4 Delineamento experimental

No laboratório de reprodução, 14 animais foram divididos em quatro grupos: G1 (n=4, com peso médio de $2.125\text{g} \pm 170,78$ e comprimento total médio de $52,25\text{ cm} \pm 1,32$), G2 (n=4, com peso médio de $1.800\text{g} \pm 535,41$ e comprimento total médio de $50,37\text{ cm} \pm 3,79$), G3 (n=4, com peso médio de $1.800\text{g} \pm 244,94$ e comprimento total médio de $51,25\text{cm} \pm 2,15$) e G4 (n=2, com peso médio de $2.300\text{g} \pm 282,48$ e comprimento total médio de $54\text{cm} \pm 2,82$). O primeiro grupo (G1) foi avaliado antes da indução hormonal e serviu como ponto inicial do processo da evolução espermática. O segundo grupo (G2) foi utilizado para avaliar o efeito da primeira dose hormonal, coletando os espécimes após doze horas após a mesma (imediatamente antes de ter sido aplicada a segunda dose nos outros exemplares). O terceiro (G3) e quarto (G4) grupo foram avaliados após a segunda dose hormonal, no momento da espermiacção (aproximadamente 220 horas-grau).

3.5 Coletas

Os peixes dos grupos G1, G2 e G3, foram anestesiados e eutanaziados por exposição a overdose de benzocaína (2 g ethylaminobenzoate: 150 ml álcool: 20 l de água) nos períodos pré-estabelecidos. Destes animais foram obtidos os dados de peso total (PT) e comprimento total (CT), para a determinação do fator de condição, representado pela fórmula $K=PT/CT^3$. Também foi determinado o ganho de peso diário (g) representado pela seguinte fórmula:

$$\text{Ganho de peso diário} = \frac{\text{pe final} - \text{pe inicial}}{\text{período experimental}} \text{ dia}$$

Após estas primeiras medições, os animais foram necropsiados para a retirada dos testículos, vísceras e fígado, que foram utilizados para a determinação dos índices gonadosomático (IGS), viscerossomático (IVS) e hepatossomático (IHS) por meio das seguintes fórmulas:

$$\begin{aligned} \bullet \text{ IGS} &= \frac{\text{so agô a ag}}{\text{stotal o í og}} \times 100 \\ \bullet \text{ IVS} &= \frac{\text{so as ísc ag}}{\text{stotal o í og}} \times 100 \\ \bullet \text{ IHS} &= \frac{\text{so o íga o g}}{\text{stotal o í og}} \times 100 \end{aligned}$$

Por outro lado, o grupo G4 foi utilizado para a análise de sêmen. Para a coleta dos gametas, os animais foram retirados dos tanques enrolados em uma toalha seca, e apoiados sobre uma placa de espuma, sobre uma mesa para melhor manipulação. Em seguida, o orifício urogenital e a nadadeira anal foram secos com papel-toalha e o sêmen foi coletado em tubo Falcom com escala graduada, realizando uma massagem no sentido crânio-caudal, descartando o sêmen contaminado com sangue e/ou urina.

Os procedimentos realizados para avaliação dos parâmetros quantitativos do sêmen são apresentados a seguir:

– Volume total liberado

Foi medido com ajuda de uma pipeta volumétrica com escala graduada de 0,1 ml.

– Concentração espermática

Foi calculada em câmara de Neubauer, utilizando uma concentração de 1µl de sêmen para 1000 µl de formol salino tamponado, mediante a seguinte fórmula:

$$\frac{Z}{ml} \times \frac{\sum p}{10 \cdot c} \times \frac{50 \cdot x \text{ diluição} \times 1000}{\text{profundidade da câmara mm}}$$

SPZ = espermatozóides

$\sum spz$ = número total de espermatozóides contados

$q.c$ = quadrados contados

$q.t$ = quadrados totais

profundidade da câmara = 0,10 mm

diluição = fator de diluição do sêmen pelo fixador

– Tempo de ativação

Para o teste de tempo de ativação ou mensuração do tempo de duração de motilidade espermática foi utilizado 5µl de sêmen, diluídos em 200µl de solução ativadora (água), tendo como resultado uma diluição sêmen/água de 0,025. Após a diluição, 5µl da mistura foram utilizados para a avaliação do tempo (em segundos) em que aproximadamente 50% dos espermatozóides mantiveram-se com ação flagelar. Para tanto, foram utilizados um microscópio de luz em objetiva de 40x, e um cronômetro digital.

– Sobrevivência

Utilizou-se 30µl de sêmen e 90µl de cada corante (eosina 5% e nigrosina 10%) para a realização da mistura, e posteriormente o esfregaço em lâmina de vidro. Após o processamento das lâminas, o material foi analisado em microscópio de luz em objetiva de 40x, sendo contadas aproximadamente 200 células, conforme recomendações do CBRA (1998). Durante a análise, células mortas apresentaram-se rosadas, devido à absorção dos corantes e as vivas brancas, por serem impermeáveis aos corantes.

3.6 Microscopia de luz

Durante a coleta testicular dos grupos G1, G2 e G3, amostras das regiões cranial, medial e caudal foram retiradas e fragmentadas de cada um dos testículos. Os fragmentos foram fixados em solução de glutaraldeído a 2.5%, 0,05 M buffer tampão e pH 7.3, durante 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em solução tampão e desidratados em álcool em série crescente de concentração, e incluídos em glicol metacrilato historesina (Historesin Leica®). Os cortes de 2 µm foram obtidos em micrótomo equipado com navalha de vidro; distendidos em água e colocados sobre lâminas; levados para secagem em estufa a 60°C por 24 horas e em seguida submetidos à coloração com Azul de Toluidina 1%. A fotodocumentação foi realizada em microscópio óptico Olympus modelo BX50 (Tokyo, Japan), junto ao Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da UNESP, Campus de Bauru.

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Para os estudos de microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos de testículo, de cada um dos grupos, foram fixados por 18 horas a 4°C, em uma solução de 8% paraformaldeído e 2.5% glutaraldeído em tampão fosfato 0.2 M e pH 7.4, e pós-fixados por 2 horas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato (pH 7.4). Após desidratação em sequência crescente de soluções de acetona, o material foi incluído em resina Araldite (502 Polyscience Inc®). A polimerização da resina foi completada em uma estufa a 60°C por 48 horas. Secções de 0,5 µm foram coradas com Azul de Toluidina 1%, para escolha dos campos. Secções ultrafinas de 60–80 nm foram coletadas em telas de cobre sem filme suporte e a seguir contrastadas em acetato de uranila. A análise e fotodocumentação foram

realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM 100, com utilização de filmes preto e branco 35 mm, Eastman 5302 (Kodak), junto ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

3.8 Estudos morfométricos

Após a captura das imagens com auxílio de microscópio óptico Olympus modelo BX 50 (Tokyo, Japan) adaptado a um sistema computarizado de análise de imagens, os estudos morfométricos foram realizados utilizando-se o programa Image Pro Plus® Version 4.1 (MediCybernetics – USA), junto ao Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da UNESP, Campus de Bauru.

Para análise da área dos túbulos seminíferos (área total com epitélio germinativo e lúmen) foram mensurados, com auxílio do programa Image Pro Plus, 15 túbulos em corte transversal, nas regiões testiculares cranial, média e caudal, totalizando 1080 túbulos. A seguir foi mensurada a área do lúmen tubular, para verificação de variações entre os diferentes grupos de tratados (G1 a G3).

Foram realizadas também contagens dos diferentes tipos de cistos germinativos dos túbulos seminíferos nos grupos G1, G2 e G3. Assim, foram contados o número de espermatogônias primárias (sg1), cistos de espermatogônias secundárias (sg2), cistos de espermatócitos primários (sc1) em diferentes fases da prófase (leptóteno/zigóteno (l/z), paquíteno (p) e diplóteno (d), cistos de espermatócitos secundários (sc2) e de espermátides nas fases inicial (sd1), intermediária (sd2) e final (sd3). Finalmente, foram computados os

túbulos com epitélio germinativo contínuo e descontínuo, para análise da cinética da espermatogênese nos diferentes grupos de estudo (G1, G2 e G3).

3.9 Análises estatísticas

Para a análise de variância (ANOVA), os valores médios obtidos do índice gonadosomático, índice viscerossomático, índice hepatossomático, área dos túbulos, área do lúmen, frequência de cistos espermatogênicos, e continuidade ou descontinuidade do epitélio germinativo, foram comparadas por teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$, quando encontradas diferenças. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa IBM SPSS PASW Statics 18 da IBM Company®, Version 18.0.0 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros biométricos

Inicialmente foram realizadas análises de peso e comprimento total dos exemplares de *L. macrocephalus* em 20/03/09. Posteriormente, após 258 dias, foram realizados novamente análise de peso e comprimento dos exemplares, antes da administração das diferentes dosagens de hormônio. As análises permitiram a observação do ganho de peso e comprimento total diário de 2,02 g e 0,02cm respectivamente (Fig. 1). Por outro lado, os valores de fator de condição K foram inversamente proporcionais ao aumento de peso e comprimento, amostrando uma queda de 5,4%, que embora seja significativa em termos numéricos não representou uma diferença estatística (Fig. 2).

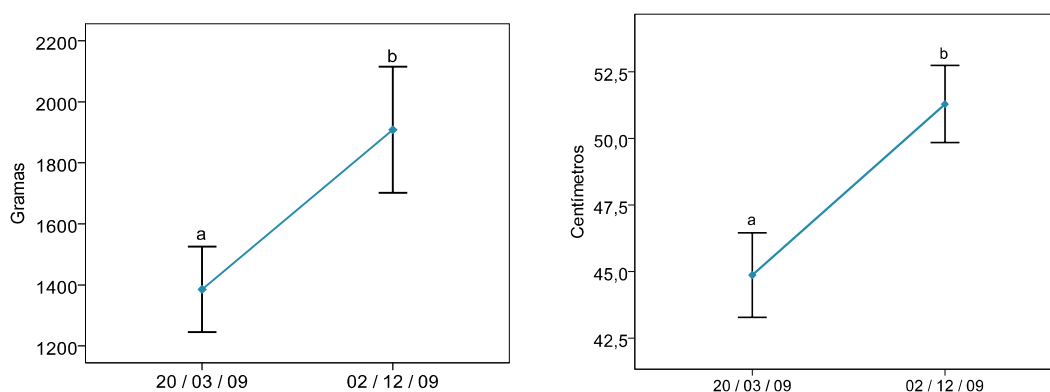


Fig. 1. Médias $\pm$ desvio padrão iniciais e 258 dias depois dos valores de Peso e Comprimento total de machos de *L. macrocephalus*. Médias com diferentes letras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

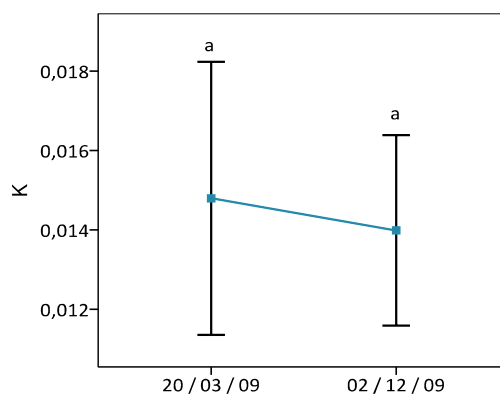


Fig. 2. Médias $\pm$ desvio padrão iniciais e 258 dias depois dos valores de Fator de Condição K em machos de *L. macrocephalus*. Médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.2 Índices biológicos

4.2.1 Índice gonadosomático

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas, 12 horas após a primeira dose hormonal, o valor médio do IGS sofreu uma notável elevação do 25,75%, valor que incrementou em 1,45% nos animais do grupo G3, com duas doses de hormônio. Estes resultados refletem a resposta positiva dos organismos ao hormônio e a pouca variação entre o IGS dos machos de *L. macrocephalus* usando uma ou duas doses de hipófise de carpa para a sua indução hormonal (Fig. 3).

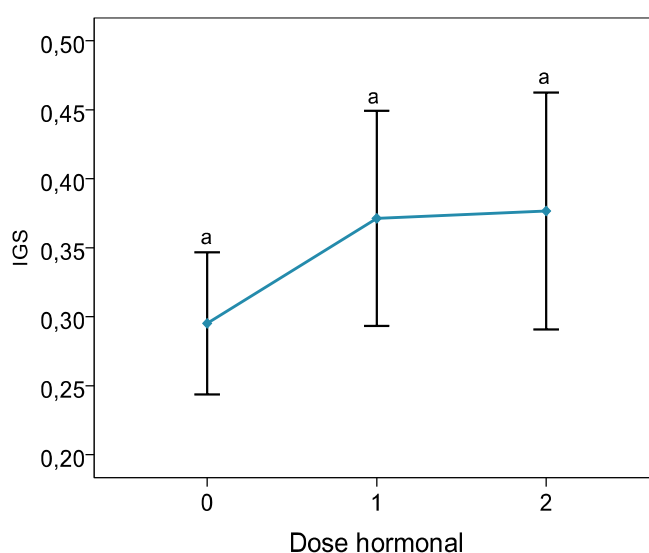


Fig. 3. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos índices gonadosomáticos por dose hormonal para machos de *L. macrocephalus* induzidos à reprodução. Médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.2.2 Índices hepatossomático e viscerossomático

Com respeito aos índices hepatossomático e viscerossomático, estes tiveram uma queda no seu valor de 18,33% e 16,23% respectivamente, após a primeira dose hormonal. Enquanto o IHS aumentou 6,53% nos espécimes com duas doses de hormônio, o IVS

sofreu uma redução leve de 4,14% ao final do experimento (Fig. 4). Nos dois casos não foram encontradas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos (G1, G2 e G3).

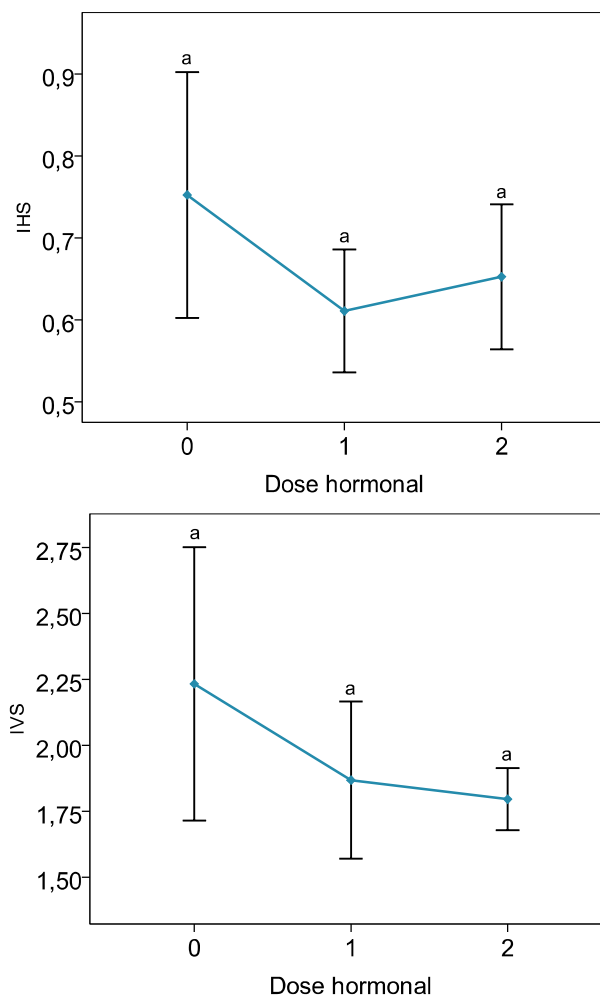


Fig. 4. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos índices hepato e viscerossomático por dose hormonal para machos de *L. macrocephalus* induzidos à reprodução. Médias com a mesma letra não indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.3 Estrutura testicular

4.3.1 Características anatômicas

Os testículos de *L. macrocephalus* são estruturas pares, alongadas e cilíndricas, situados na cavidade abdominal, ventralmente ao rim, ventrolateralmente à vesícula gasosa

e dorsalmente ao tubo digestório; apresentam-se livres na porção cranial e média, porém unem-se no terço posterior formando um ducto espermático comum (Fig. 5), que se abre na papila urogenital, por onde o sêmen é eliminado. Os testículos se encontram em estado maduro e apresentam uma coloração de aspecto leitoso. A superfície externa apresenta-se lisa com pequenos sulcos e reentrâncias. Não foram observadas variações na forma e coloração nos testículos, entre os peixes dos diferentes grupos estudados. Os testículos são ricamente vascularizados, sendo observado, no sentido longitudinal, um grande vaso sangüíneo, que apresenta inúmeros ramos (Fig. 6). O ducto testicular principal localiza-se ventro-lateralmente e percorre todo o testículo, no sentido crânio-caudal (Figs. 7 e 8).

4.3.2 Características histológicas

Os testículos de *L. macrocephalus*, apresentaram-se revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo espesso, denominada túnica albugínea que se projeta para o interior do órgão, delimitando e sustentando os túbulos seminíferos (Figs 9, 10 e 11). A partir da túnica albugínea foi observado um tecido intertubular constituído de fibras colágenas, vasos sangüíneos, células de Leydig e células peritubulares mióides, que junto à lâmina basal delineiam os túbulos seminíferos (Figs. 12 e 13). Os túbulos seminíferos são numerosos, de diferentes diâmetros e se dispõem lado a lado (Fig. 14) para formar uma rede intertubular anastomosada (Figs. 15, 16, 17, 18, 19 e 20). As células germinativas se apresentam individualizadas (espermatogônias primárias) ao longo do túbulo, ou em grupos de células envolvidas pelos processos citoplasmáticos das células císticas ou de Sertoli, constituindo o cisto germinativo (espermatogônias secundárias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides) (Figs. 21, 22 e 23). Cada túbulo contém múltiplos cistos e cada cisto por sua vez contém células germinativas aparentemente na mesma fase de desenvolvimento

(Figs 24 e 25). Não foram observadas diferenças significativas a nível microscópico, entre as porções cranial, média e caudal dos testículos dentre os diferentes grupos tratados.

Neste contexto, a análise histológica dos testículos de *L. macrocephalus* permite classificá-lo como sendo do tipo tubular anastomosado, espermatogonial irrestrito com espermatogênese do tipo cística (Fig. 26).

4.3.3 Células da linhagem espermatogênica

Os tipos de células germinativas em *L. macrocephalus* foram descritos seguindo a seqüência do processo espermatogenético. De acordo com as características observadas em microscopia de luz e eletrônica de transmissão, seis tipos de células germinativas foram identificadas em todos os grupos tratados: espermatogônias primárias, espermatogônias secundárias, espermátocitos primários, espermátocitos secundários, espermátides e espermatozóides.

4.3.3.1 Espermatogônias primárias

São as células germinativas de maior tamanho e foram encontradas isoladas ou em duplas na parede dos túbulos seminíferos, rodeadas por células de Sertoli. Apresentaram núcleo grande, esférico, localizado na região central do citoplasma, e com um único nucléolo elétron-denso bastante desenvolvido, localizado em posição excêntrica (Figs. 27, 28 e 29). A cromatina observada é delicada, pouco condensada e distribuída de forma homogênea. O citoplasma é claro e abundante, cujo limite dificilmente é observado em microscopia de luz. Ultraestruturalmente, pode-se observar um grande número de mitocôndrias arredondadas, e entre elas várias massas eletrondensas, denominadas de

cimento intermitocondrial (nuages). Algumas nauges também foram observadas bem próximas à membrana nuclear (Figs. 30, 31 e 32).

4.3.3.2 Espermatogônias secundárias

Apresentaram-se em grupos de número variado, interligadas por pontes citoplasmáticas e envoltas por células de Sertoli, organizando-se em cistos (Figs. 33, 34 e 35). O núcleo é grande, bastante evidente e um pouco mais corado que nas espermatogônias primárias, ocupando quase todo o volume da célula e com um ou vários nucléolos evidentes (Fig. 36). Na microscopia eletrônica de transmissão, apresentam-se com núcleo central, volumoso, ovalado ou esferoidal, contendo cromatina pouco condensada, formando pequenos grumos, que dão ao núcleo aspecto heterogêneo. Foram observados de um a dois nucléolos, bastante eletrondensos com contorno regular. Citoplasma pouco eletrondenso, com presença de mitocôndrias arredondadas e, entre algumas delas, a presença de acúmulos de material eletrondenso, o cimento intermitocondrial, em pequena quantidade, quando comparadas com a das espermatogônias primárias (Figs. 37, 38 e 39).

4.3.3.3 Espermátocitos primários

Encontraram-se agrupados formando cistos. O citoplasma é hialino e escasso, quase totalmente ocupado pelo núcleo. Dependendo do estágio da prófase I, as células foram identificadas em: *leptóteno/zigóteno*, *paquíteno* e *diplóteno/MI*, baseadas nas características nucleares. Em *leptóteno/zigóteno*, a heterocromatina era observada como pequenos pontos próximos à membrana nuclear (Figs. 40 e 41); em *paquíteno*, os cromossomos estavam mais evidenciados e de aspecto filamentosos, devido ao processo de condensação mais adiantado, os filamentos estavam direcionados desde a membrana nuclear ao centro do

núcleo (Figs. 42 e 43); em *diplóteno/MI*, os cromossomos com maior condensação da cromatina, eram facilmente identificados como filamentos fortemente marcados, desde a periferia nuclear ao centro do núcleo ou na região equatorial (Figs. 44, 45, 46 e 47)

Ultraestruturalmente observou-se núcleo esferoidal, grande e deslocado a um dos pólos celulares, com cromatina irregularmente condensada dando uma aparência granular ao núcleo (Figs. 48, 49 e 50). Ocorreu formação dos complexos sinaptonêmicos, característicos da fase de zigóteno da prófase I da meiose; quando completos, foram formados por duas faixas eletrondensas estreitas, alongadas e paralelas, chamadas elementos laterais, interconectadas a uma faixa central mais clara denominada elemento medial (Figs 51 e 52).

4.3.3.4 Espermatócitos secundários

Células resultantes da divisão meiótica dos espermatócitos primários, foram raramente observados, próximos a espermatócitos primários em divisão (Fig. 53).

4.3.3.5 Espermátides

Como resultado da segunda divisão meiótica, os espermatócitos secundários se convertem em espermátides. Estas são células menores que os espermatócitos secundários e mais abundantes nos cistos germinativos. Foi possível caracterizar três tipos de espermátides considerando as características de condensação nuclear e de formação do flagelo (E1, E2 e E3). Em E1(espermátide inicial), as células apresentaram um formato arredondado com pouco citoplasma e núcleo grande com início de condensação da cromatina (Figs. 54 e 55). Em E2 (espermátide intermediárias), os tamanhos dos núcleos diminuíram, em relação ao observado nas espermátides iniciais (Figs. 56 e 57). Em E3

(espermátide tardia), as células foram observadas com flagelo desenvolvido dentro dos cistos, com uma porção hialina de citoplasma entre o flagelo e o núcleo (Figs. 58 e 59). Ultraestruturalmente, observou-se que as espermátides iniciais apresentavam um núcleo esférico grande com cromatina distribuída em forma irregular (Fig. 60). A medida que o processo de espermiogênese avançava, as espermátides apresentavam-se com cromatina mais condensada, concomitantemente iniciou-se a formação de uma depressão na periferia do núcleo, denominada fossa nuclear, que foi se tornando profunda para alojar o centríolo proximal e distal, a partir do qual se percebeu a formação do flagelo (Figs. 61, 62 e 63). Finalmente observou-se uma maior condensação da cromatina nuclear nas espermátides tardias, tornando-se mais compacta, e o citoplasma deslocou-se no sentido do flagelo, formando a bainha citoplasmática, originando o canal citoplasmático, separando as mitocôndrias do flagelo e originando a peça intermediária (Figs. 64, 65 e 66).

4.3.3.6 Espermatozóides

Os espermatozóides de *L. macrocephalus* apresentam cabeça arredondada, núcleo com cromatina condensada e sem acrossoma. A fossa nuclear se apresentou em forma de U invertido, abrigando o complexo centriolar (centríolos proximal e distal). Os centríolos proximal e distal são perpendiculares um ao outro. A peça intermediária é longa apresentando mitocôndrias de forma arredondada. Essas organelas estão separadas do segmento inicial do flagelo por um canal citoplasmático. O flagelo está em posição perpendicular e medial à base do núcleo, está envolvido pela membrana flagelar e apresenta axonema do tipo 9+2 (nove duplas de microtúbulos periféricos e uma dupla central). Nadadeiras axonemais foram observadas (Fig. 67).

4.3.4 Células de Sertoli

Este tipo celular foi sempre observado associado a células germinativas, envolvendo-as individualmente, como ocorreu com as espermatogônias primárias, ou formando cistos, como foram observados em espermatogônias secundárias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides. Em microscopia de luz, o núcleo apresenta-se evidente e em formato triangular (Figs. 68 e 69). As análises ultraestruturais permitem observar os prolongamentos citoplasmáticos envolvendo as células da linhagem germinativa, formando a parede do cisto (Fig. 70). O núcleo apresentou forma triangular, com cromatina em forma de finos grânulos distribuídos por todo o núcleo, com regiões mais eletrondensas, junto à membrana nuclear, o citoplasma é escasso e fino, com mitocôndrias irregulares e redondas (Figs. 71 e 72). Foram observadas junções aderentes e desmossômicas entre células de Sertoli, e somente aderentes entre células germinativas e Sertoli (Figs. 73, 74 e 75).

4.3.5 Sistema de ductos eferentes

As análises mesoscópica e ultraestrutural dos moldes testiculares evidenciaram que os túbulos seminíferos estão orientados dorsoventralmente, e apresentam inúmeras anastomoses intertubulares (Figs. 76 e 79). Foi possível observar também que os túbulos seminíferos se conectam diretamente ao ducto testicular principal, sem a presença de ductos eferentes intermediários. A conexão dos túbulos seminíferos ocorre em diferentes segmentos, ao longo de todo o ducto testicular principal (Figs. 77 e 78). Todas as características mesoscópicas da via seminífera de *L. macrocephalus* foram confirmadas pela análise de microscopia eletrônica de varredura (Figs. 79, 80 e 81).

A análise histológica do ducto testicular principal evidenciou a presença de três camadas distintas: (1) uma camada superficial de peritônio, (2) uma camada intermediária de tecido conjuntivo, contendo células de músculo liso e vasos sanguíneos, e (3) internamente uma de epitélio simples cuboidal de revestimento (Fig. 82). Em secções histológicas transversais do ducto testicular principal foi possível observar a presença de epitélio germinativo (Figs. 83, 84 e 85), e uma abrupta mudança para o epitélio cuboidal de revestimento ductular (Figs. 86, 87, 88 e 89).

4.4 Análise seminal

O sêmen de *L. macrocephalus* obtido após as duas doses de hormônio apresentou-se de coloração branca e bastante viscoso. A média do volume obtido foi de 0,45 ml $\pm$ 0,21, correspondendo a 0,19 ml $\pm$ 0,06 de sêmen por quilo⁻¹ de reprodutor. A concentração espermática média foi de $6,09 \times 10^9$ espermatozóides por mililitro⁻¹. O tempo de duração da motilidade espermática de 50 % dos espermatozóides foi em média de 56s $\pm$ 14,42. Finalmente, a média da sobrevivência foi de 96,5% $\pm$ 1,06, sendo este um dos parâmetros mais importantes e um bom indício da qualidade espermática.

4.5 Análises morfométricas

4.5.1 Área do túbulo seminífero

Após 12 horas da aplicação da primeira dose de hormônio, o valor médio da área dos túbulos apresentou um incremento de 2,52%, valor que continuou aumentando em 3,54%, nos indivíduos com duas doses de hormônio. Embora não apresentaram diferenças estatísticas, estes valores indicam uma mudança na área dos túbulos seminíferos após os tratamentos hormonais (Fig. 90).

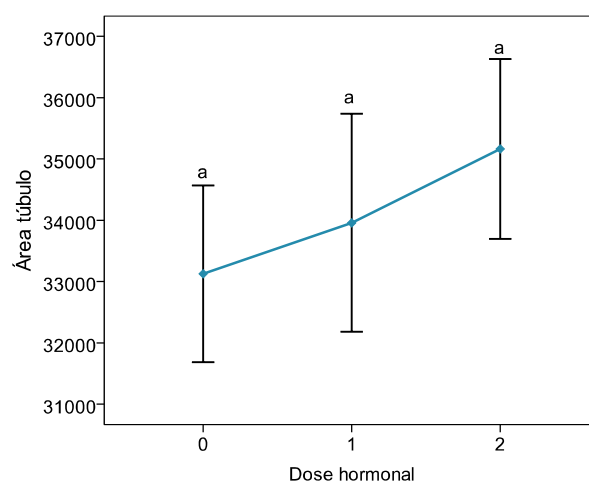


Fig. 90. Valores médios $\pm$ desvio padrão da área do túbulo medida em μm^2 por dose hormonal. Médias com a mesma letra não indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.5.2 Área do lúmen tubular

A área do lúmen tubular aumentou 4,60% entre os espécimes do grupo controle (G1) e no do grupo com uma única dose hormonal (G2). Foi observado um aumento da área do lúmen tubular de 12,44%, após a segunda dose hormonal. Neste caso em particular, as diferenças foram estatisticamente significativas, encontrando-se principalmente entre os animais de G1 e os que foram injetados duas vezes com hormônio (G3) (Fig. 91).

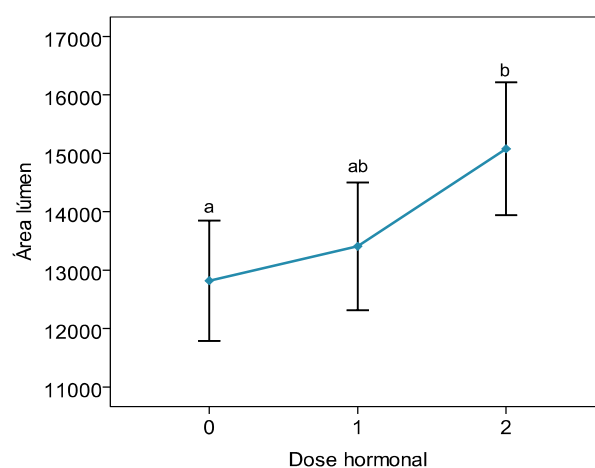


Fig. 91. Valores médios $\pm$ desvio padrão da área do lúmen tubular medida em μm^2 por dose hormonal. Médias com a mesma letra não indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.5.3 Contagens dos cistos germinativos

Com base nas análises de contagem do número total dos diferentes tipos de cistos germinativos (Fig. 92), observou-se que a quantidade de espermatogônias primárias (sg1) não variaram significativamente, entre os grupos G1 (0 dose de hormônio) e G2 (com uma dose de hormônio 1). Entretanto, no grupo G3 (com duas doses de hormônio) ocorreu um aumento significativo (111,72%) do número total de espermatogônias primárias. Quanto aos cistos de espermatogônias secundárias (sg2) observou-se um incremento, do número total de cistos germinativos (21,16%) 12 horas após aplicação da primeira dose hormonal, valor aproximadamente estável nos animais do grupo G3.

Referente à análise do número total de cistos germinativos de espermatócitos primários (sc1) observou-se após 12 horas da aplicação da primeira dose hormonal um aumento do número de cistos de espermatócitos primários, na fase de leptóteno/zigóteno (sc1(l/z)) (81,65%) e uma redução após 9 horas da aplicação da segunda dose hormonal (34,42%). Posteriormente, foi observado um aumento do número de cistos germinativos de espermatócitos primários, na fase de paquíteno (sc1(P)), de 62,65% após a aplicação da segunda dose hormonal. Quanto ao número de cistos de espermatócito primário, na fase de diplóteno (sc1(D)), observou-se uma queda de 72,92% após a primeira dose hormonal e um aumento de 109,52%, depois da segunda dose. Considerando a pequena quantidade encontrada de cistos de espermatócitos secundários (sc2), não foi possível observar uma variação significativa nos diferentes grupos experimentais.

No que se refere, à contagem de cistos germinativos de espermátides (sd) observou-se que a quantidade de cistos de espermátides iniciais (sd1) se manteve estável, no decorrer do experimento e só foi possível observar um aumento de 5,74%, entre o grupo G1 e o que

recebeu uma dose hormonal (G2). Por sua vez, o número de cistos germinativos de espermatídes intermediárias (sd2), assim como espermatídes finais (sd3), apresentaram uma diminuição após 12 horas da primeira dose hormonal de 18,70% e 41,76%, respectivamente, valor que em sd2 continuou diminuindo 41,65% nos indivíduos de G3, e em sd3 incrementando num 18,23%, sendo possível relacionar a queda de sd2 como o aumento de sd3 em animais com duas doses de hormônio.

A análise da frequência percentual, dos diferentes cistos germinativos (Fig. 92), demonstrou que os cistos de espermatogônias primárias (sg1), espermatócitos primários, na fase de diplóteno (sc1(d)) no grupo G2, espermatídes intermediárias (sd2) e espermatídes finais (sd3) apresentaram os valores mínimos, muito próximos ao 5% de todos os cistos encontrados para cada dose hormonal. Seguidos a estes valores encontram-se os cistos de espermatócitos primários, na fase paquíteno (sc1 (p)), espermatócitos primários, na fase diplóteno (sc1 (d)) nos grupos G1 e G3 e espermatídes iniciais (sd1) com porcentagens ao redor do 10-15% de ocorrência no total dos cistos contabilizados. Dentre os cistos mais encontrados, os de espermatogônias secundárias (sg2) apresentaram uma frequência percentual em todos os grupos, ao redor de 20%. Finalmente, os valores de ocorrência percentual de cistos de espermatócitos primários, na fase de leptóteno/zigóteno (sc1(l/z)), foram os mais freqüentes em cada um dos tratamentos (23 % em G1, 43% em G2 e 34% em G3).

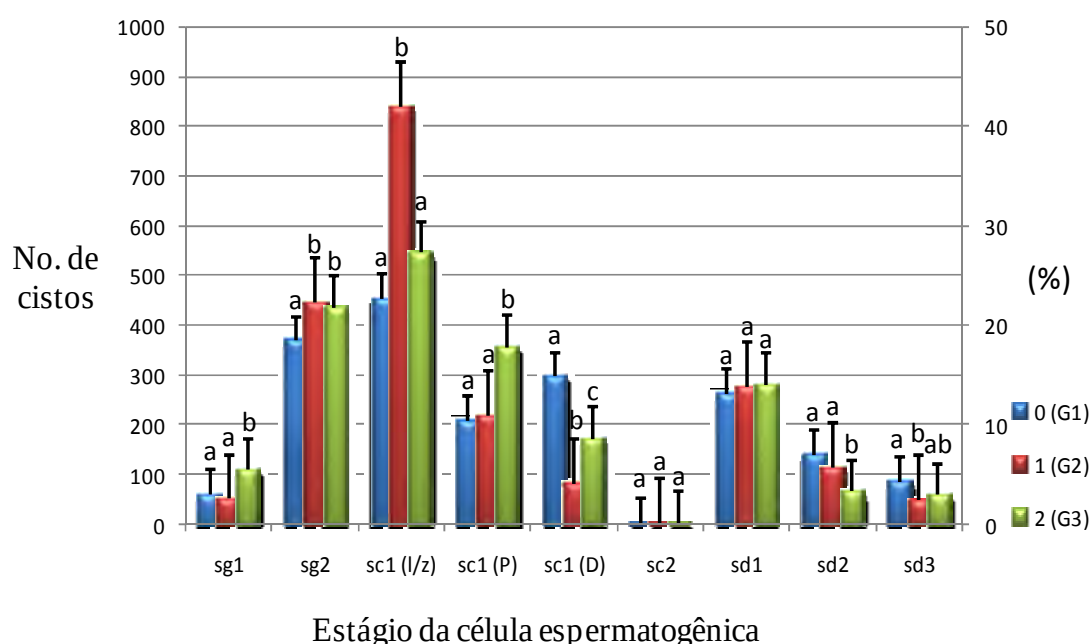


Fig. 92. Número total e frequência percentual $\pm$ desvio padrão dos diferentes cistos espermatogênicos presentes nos testículos de *L. macrocephalus* submetidos às diferentes doses hormonais. Valores com a mesma letra não indicam diferenças significativas entre as doses de hormônio ($p < 0,05$). (sg1) espermatogônias primária; (sg2) espermatogônia secundária; (sc1(l/z)) espermatócito primário na fase de leptóteno/zigóteno; (sc1(P)) espermatócito primário na fase de paquíteno; (sc1(D)) espermatócito primário na fase de diplóteno; (sd1) espermatíde inicial; (sd2) espermatíde intermediária; (sd3) espermatíde final.

Com respeito aos valores médios do número de cistos germinativos por túbulo, nos diferentes estágios espermatogênicos, de acordo com a dose hormonal observou-se como mais expressivos, os valores dos cistos de espermatócitos primários, na fase de leptóteno/zigóteno (sc1(l/z)) em G1, G2 e G3 (com valores de 3.8, 7 e 4.5 respectivamente). Seguidos a estes valores, observou-se que os valores médios do número de cistos de espermatogônias secundárias (sg2) foram ao redor de 3.0 e 3.5 cistos por túbulo. Quanto ao número de cistos de espermatócitos primários, na fase de paquíteno (sc1(P)), observamos valores de 1.71 em G1 e 1.82 para G2, aumentando para 3.0 o número de cistos no grupo G3. Quanto aos cistos de espermatídes iniciais (sd1), observamos em todos os tratamentos estudados um valor aproximado a dois cistos por túbulo. Finalmente, o número de espermatogônias primárias (sg1), cistos de espermatídes secundárias (sd2) e

espermátides finais (sd3) apresentaram os menores valores, durante todos os tratamentos (sg1 de 0.5, 0.42, 0.9; sd2 de 1.15, 0.94, 0.55; sd3 de 0.71, 0.49, 0.41, em G1, G2 e G3, respectivamente) (Fig. 93).

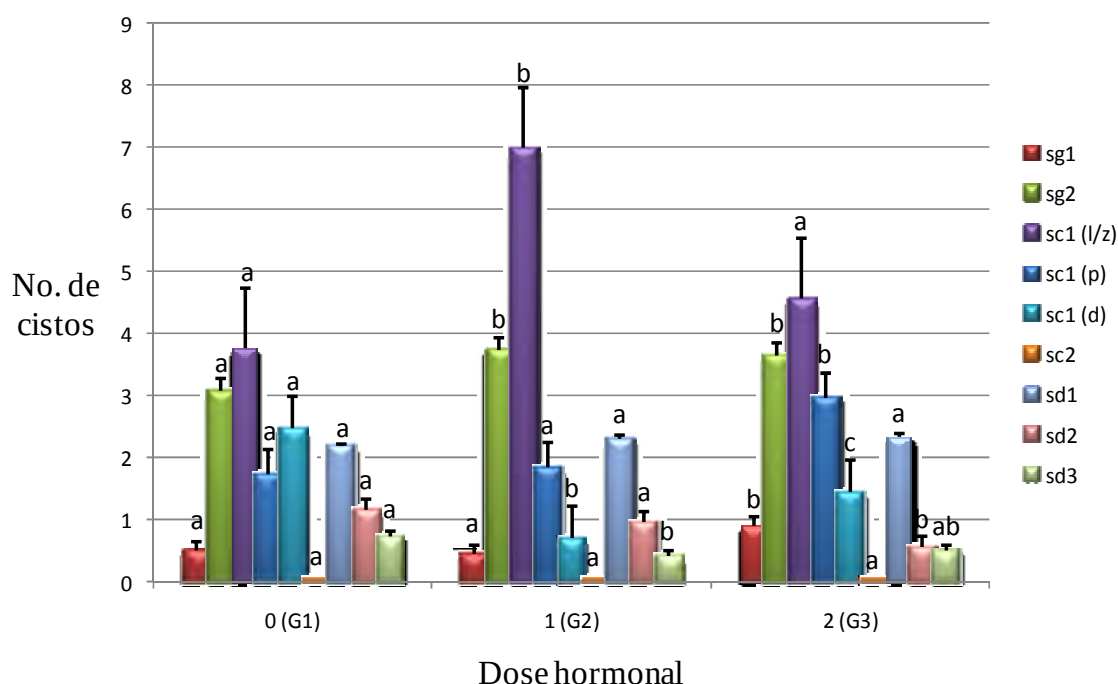


Fig. 93. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos diferentes cistos espermatogênicos encontrados por túbulo nos testículos de *L. macrocephalus* submetidos às diferentes doses hormonais. Médias com a mesma letra não indicam diferenças significativas entre as doses de hormônio ($p < 0,05$). (sg1) espermatogônias primária; (sg2) espermatogônia secundária; (sc1(l/z)) espermátócito primário na fase de leptóteno/zigóteno; (sc1(P)) espermátócito primário na fase de paquíteno; (sc1(D)) espermátócito primário na fase de diplóteno; (sd1) espermátide inicial; (sd2) espermátide intermediária; (sd3) espermátide final.

Com base nas análises de continuidade e descontinuidade do epitélio germinativo, nos túbulos seminíferos, os animais controle (G1) apresentaram os valores máximos de túbulos contínuos (~ 22) e mínimos em descontínuos (~ 7); cifras que foram mudando progressivamente nos testículos dos animais tratados com dose hormonal, primeiro com a diminuição dos túbulos contínuos e aumento nos descontínuos (34,78%), 12 horas após aplicação a primeira dose hormonal, e depois com os valores mínimos dos túbulos contínuos (~ 10) e máximos dos descontínuos (~ 20), após 9 horas do último tratamento

hormonal. Estes resultados, que apresentaram diferenças estatísticas, refletem a hormônio dependência das variações encontradas e a relação direta entre o aumento das doses hormonais com o aumento da descontinuidade do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos (Figs. 94 e 95).

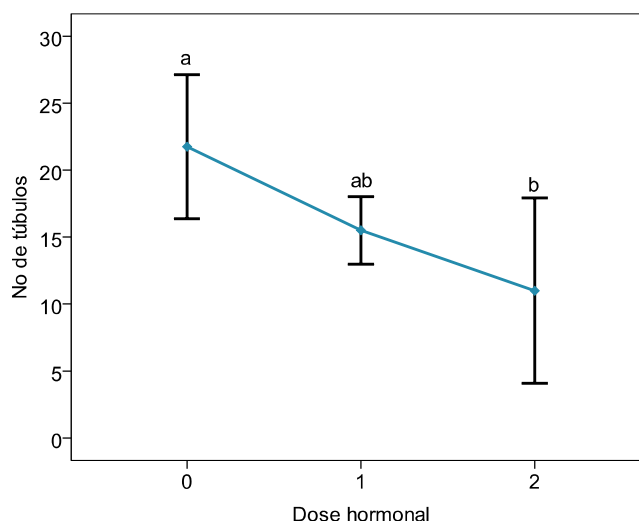


Fig. 94. Valores médios $\pm$ desvio padrão do número de túbulos seminíferos com epitélio germinativo contínuo encontrados por testículo em *L. macrocephalus* submetidos às diferentes doses hormonais. Médias com a mesma letra não indicam diferenças significativas entre as doses de hormônio ($p < 0,05$).

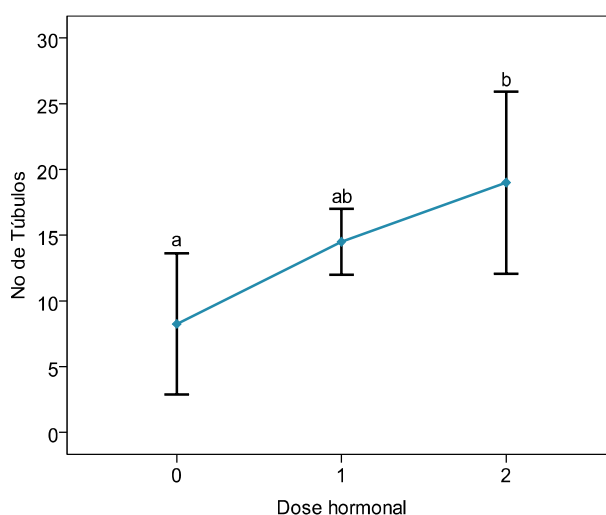
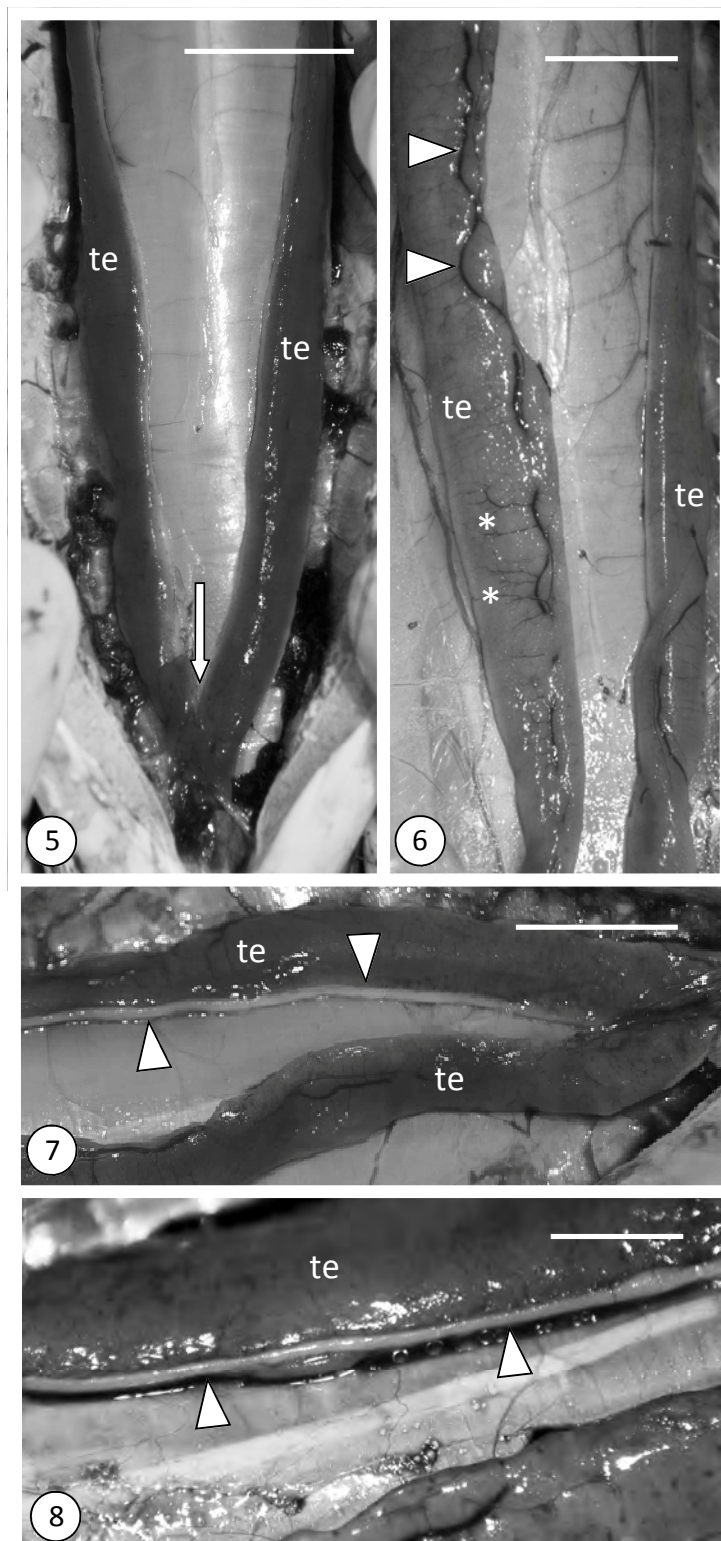


Fig. 95. Valores médios $\pm$ desvio padrão do número de túbulos seminíferos com epitélio germinativo descontínuo encontrados por testículo em *L. macrocephalus* submetidos às diferentes doses hormonais. Médias com a mesma letra não indicam diferenças significativas entre as doses de hormônio ($p < 0,05$).

Características anatômicas

- Figura 5.** Testículos maduros (te), destacando a união na parte caudal das gônadas para formar o ducto espermático comum (seta), (barra = 25 mm).
- Figura 6.** Detalhe de vaso sangüíneo (cabeças de setas) que se ramifica em pequenos ramos laterais (asteriscos), (barra = 11,6 mm).
- Figuras 7 e 8.** Testículos maduros (te) com destaque para o ducto testicular principal (cabeças de setas), (barra em 7 = 25 mm; barra em 8 = 6.7 mm).



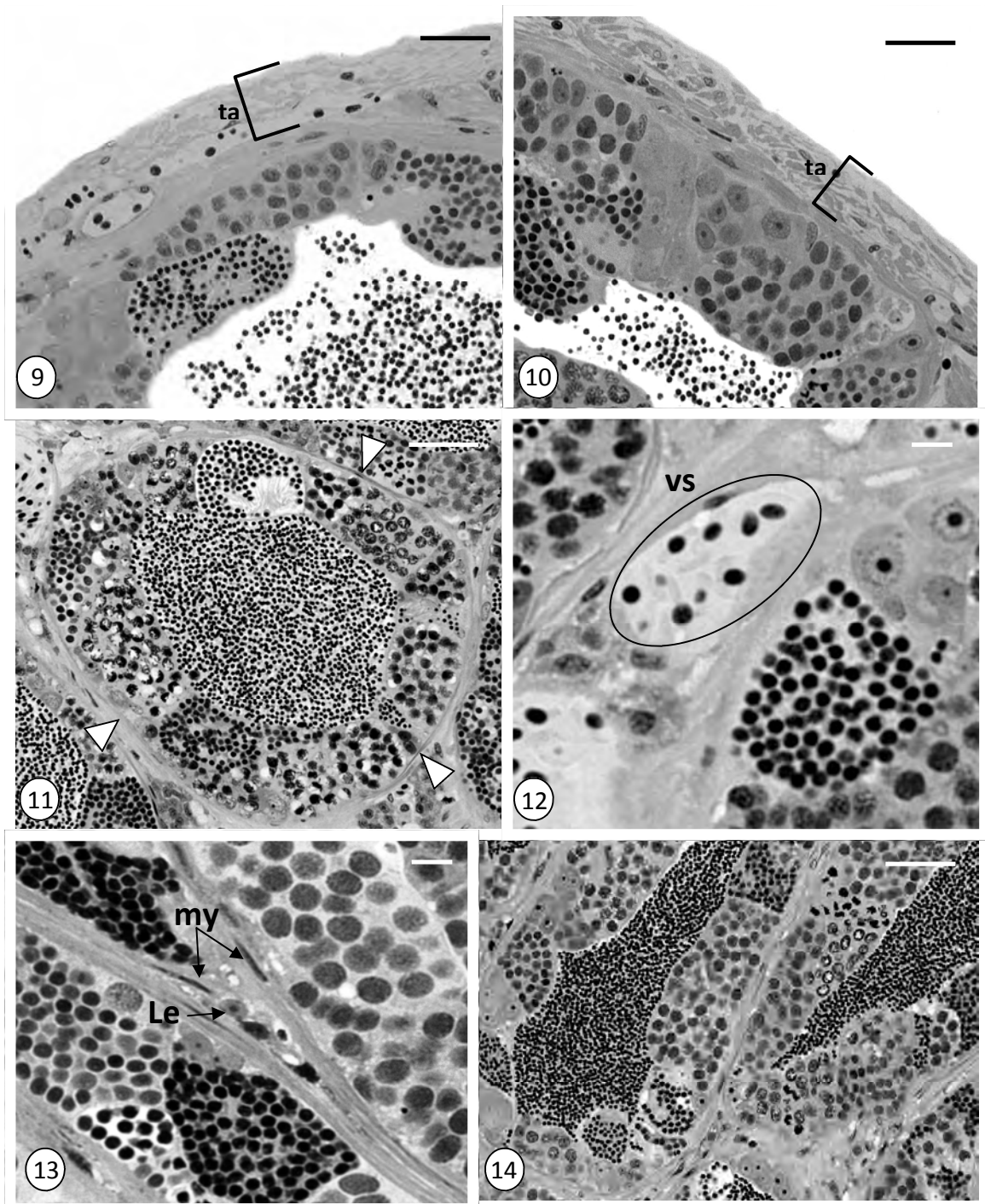
Características histológicas

Figuras 9 e 10. Fotomicrografias da periferia testicular, destacando a túnica albugínea (ta), (barras = 20µm; Azul de Toluidina).

Figuras 11. Corte transversal de um túbulo seminífero, destacando os septos intertubulares que sustentam e separam os túbulos entre si (cabeças de seta) (barra = 30µm; Azul de Toluidina).

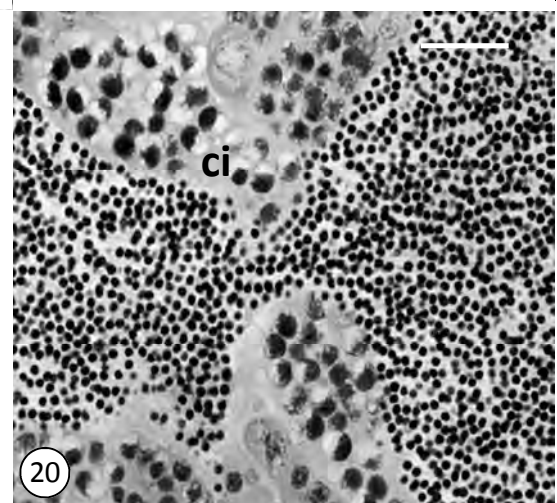
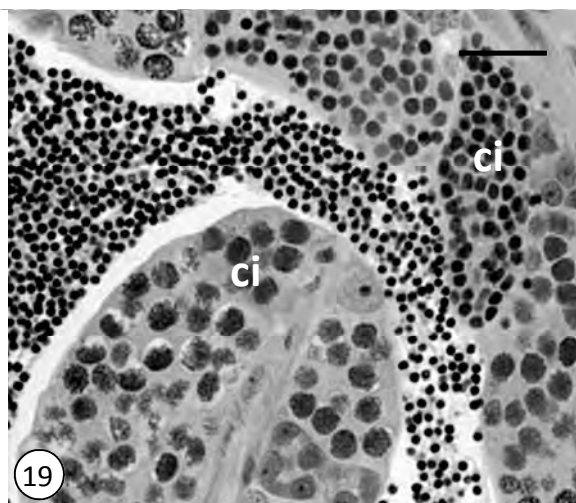
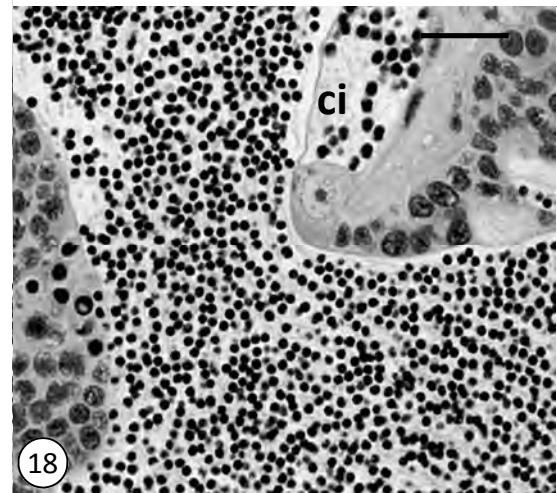
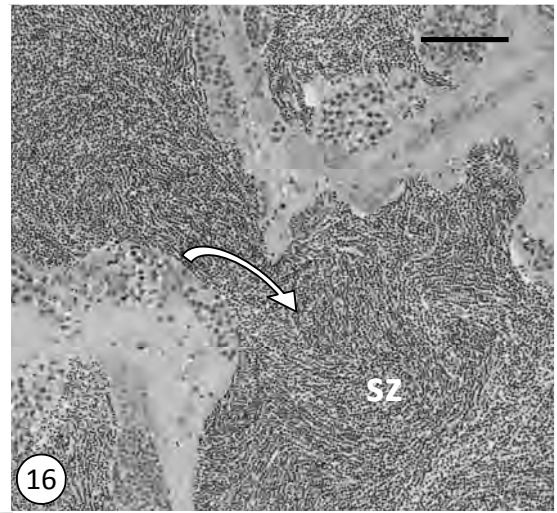
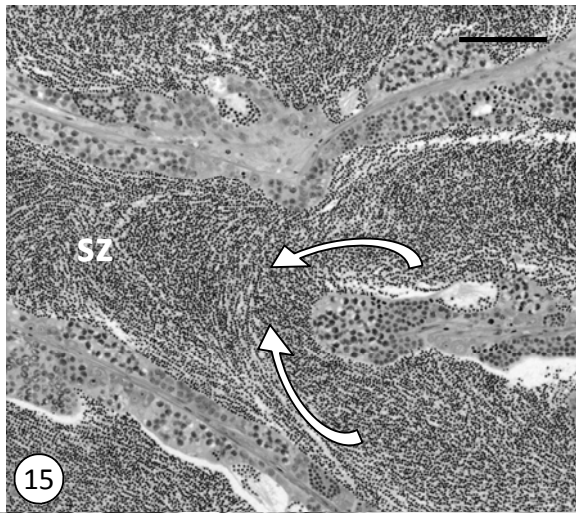
Figuras 12 e 13. Tecido intertubular apresentando: vaso sangüíneo (vs), células mióides (my) e células de Leydig (Le), (barras = 6µm; Azul de Toluidina).

Figura 14. Corte longitudinal de dois túbulos seminíferos, mostrando a disposição antes de sofrer anastomoses, (barra = 30µm; Azul de Toluidina).



Características histológicas

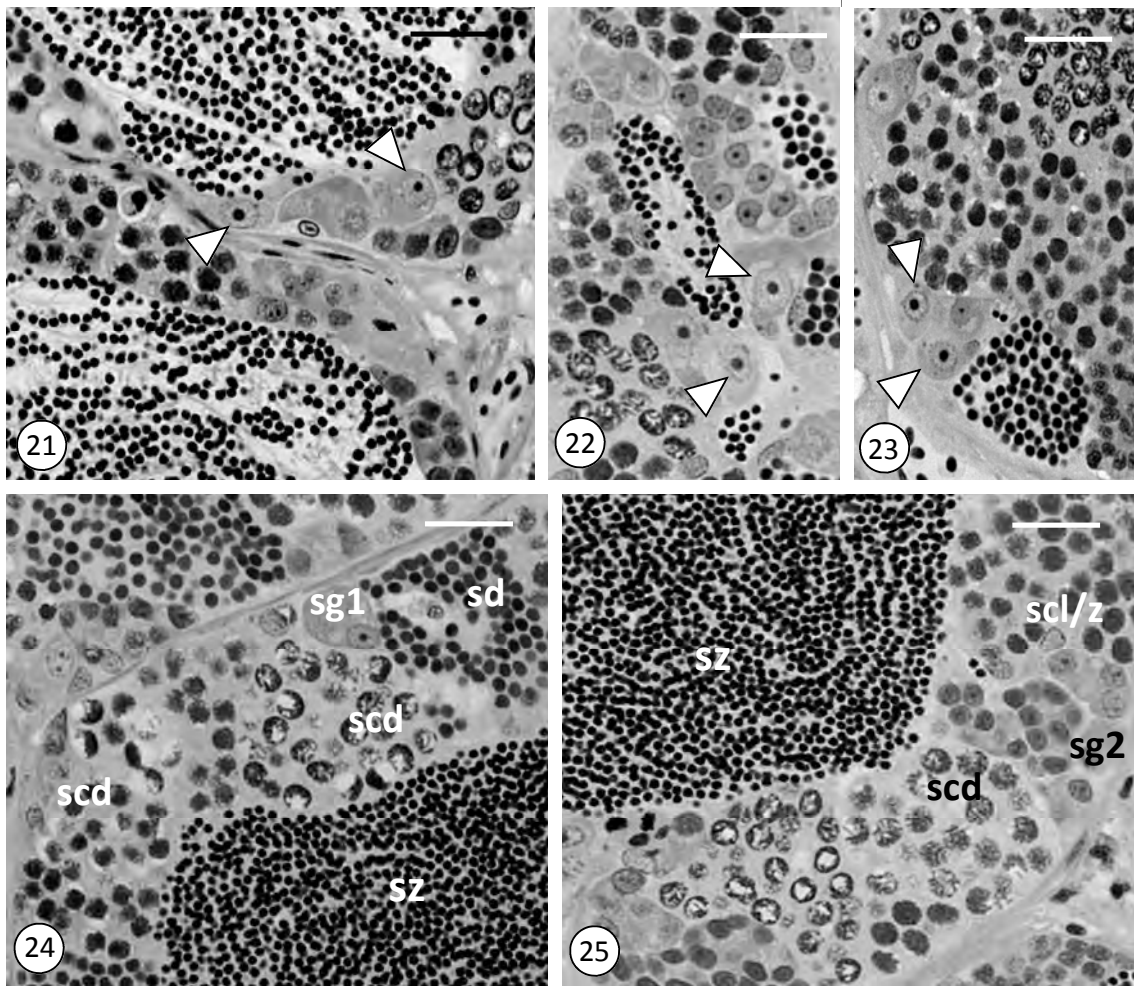
- Figuras 15 e 16.*** Vista panorâmica de anastomoses intertubulares, como destaque para a rede intertubular anastomosada (setas), formando uma rede intertubular anastomosada, permitindo uma grande quantidade de espermatozóides (sz) na luz tubular, (barras = 30µm; Azul de Toluidina).
- Figuras 17, 18, 19 e 20.*** Detalhes da parede tubular apresentando cistos de células germinativas (ci) em diferentes estágios de desenvolvimento, (barra em 17 = 30µm; barra em 18, 19 e 20 = 20 µm; Azul de Toluidina)



Características histológicas

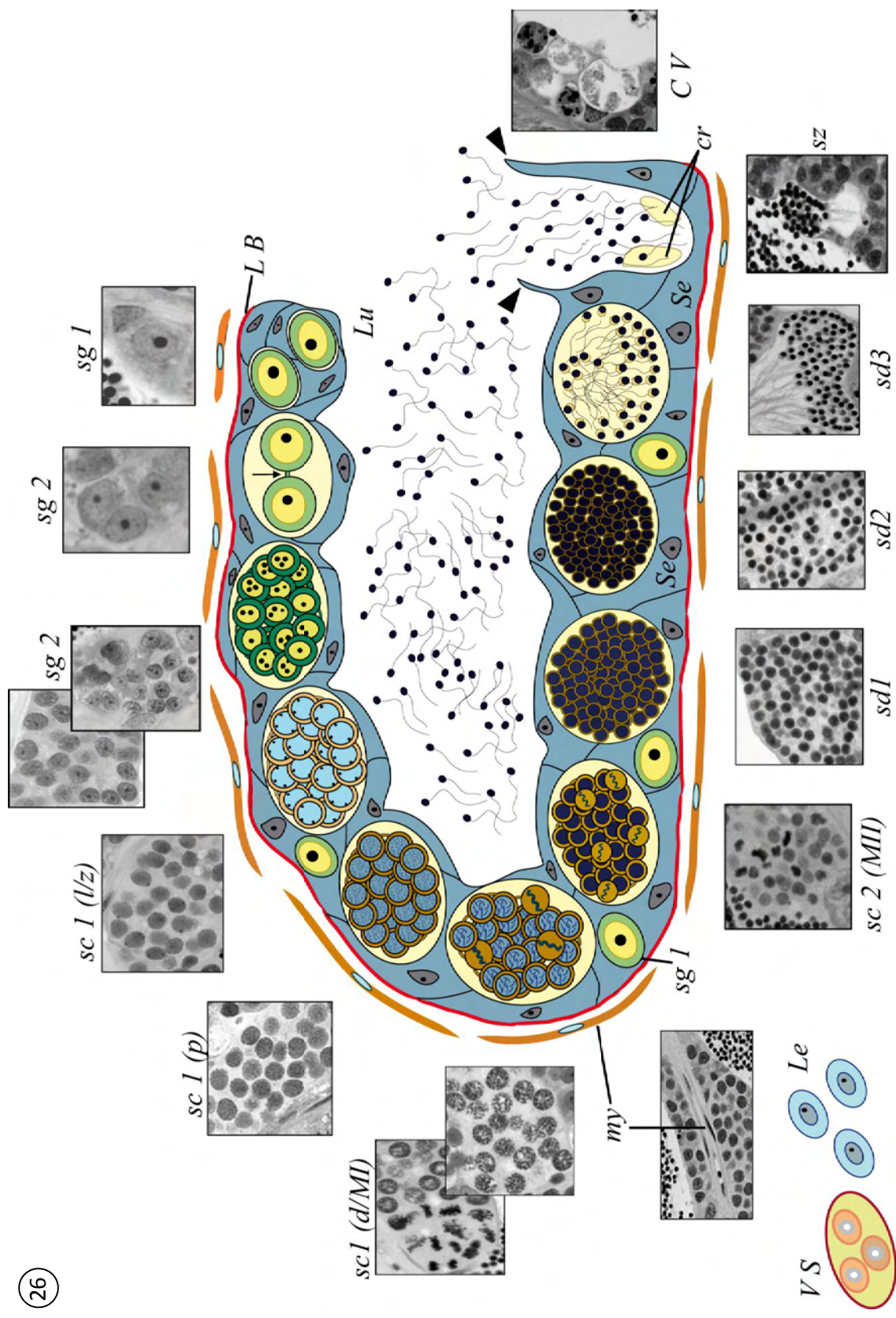
Figuras 21, 22 e 23. Túbulos seminíferos apresentando espermatogônias primárias (cabeças de seta) distribuídas ao longo do epitélio germinativo tubular, (barras = 20 µm; Azul de Toluidina).

Figuras 24 e 25. Túbulos seminíferos apresentando cistos em diferentes fases de desenvolvimento. Espermatogônia primária (sg1), espermatogônia secundária (sg2), espermatócitos primários, na fase de leptóteno / zigóteno (scl/z) e diplóteno (scd), espermátides (sd), e espermatozóides, no lúmen tubular (sz), (barras = 30 µm; Azul de Toluidina).



Células da linhagem espermatogênica

Figura 26. Segmento de túbulo seminífero ilustrando a organização testicular e a sequência do processo espermatogênico, em *L. macrocephalus* hormonalmente induzido. O órgão está dividido em dois compartimentos: o tubular (germinal) e o intertubular (intersticial). No compartimento intertubular, células de Leydig (*Le*) estão localizadas perto dos vasos sanguíneos (*VS*). O compartimento tubular está formado pelo epitélio seminífero e o lúmen; e está delineado pela túnica própria, que consiste de uma camada de células mióides (*my*) e a lâmina basal (*LB*) do epitélio germinativo. O epitélio germinativo está organizado em cistos, que são formados quando uma espermatogônia primária (*sg1*) é completamente envolvida por uma ou várias células de Sertoli (*Se*). Nos cistos, as células germinativas estão interconectadas pelas pontes citoplasmáticas (seta em *sg2*), responsáveis pelo desenvolvimento sincrônico das células. É possível observar espermatogônias primárias (*sg1*) ao longo de todo o túbulo, caracterizando ao testículo, como sendo do tipo espermatogonial irrestrito. Por outro lado, a progressão celular durante a espermatogênese é a seguinte: espermatogônia primária (*sg1*), espermatogônia secundária (*sg2*), espermatócito primário em leptóteno / zigóteno (*sc1 (l/z)*), espermatócito primário, em paquíteno (*sc1 (p)*), espermatócito primário, em diplóteno/metáfase I (*sc1 (d/M1)*), espermatócito secundário/metáfase II (*sc2 (MII)*), espermatíde inicial (*sd1*), espermatíde intermediária (*sd2*), espermatíde final (*sd3*), espermatozóides (*sz*). Ao final do processo ocorre a espermição, que envolve várias mudanças nas junções celulares das células de Sertoli permitindo que os cistos se abram (cabecinhas de seta) liberando os espermatozóides ao lúmen tubular (*Lu*). Os cistos agora vazios (*CV*) de células germinativas estão preenchidos com os corpos residuais (*cr*) dos espermatozóides que serão fagocitados pelas células de Sertoli.



Células da linhagem espermatogênica

Espermatogônia primária

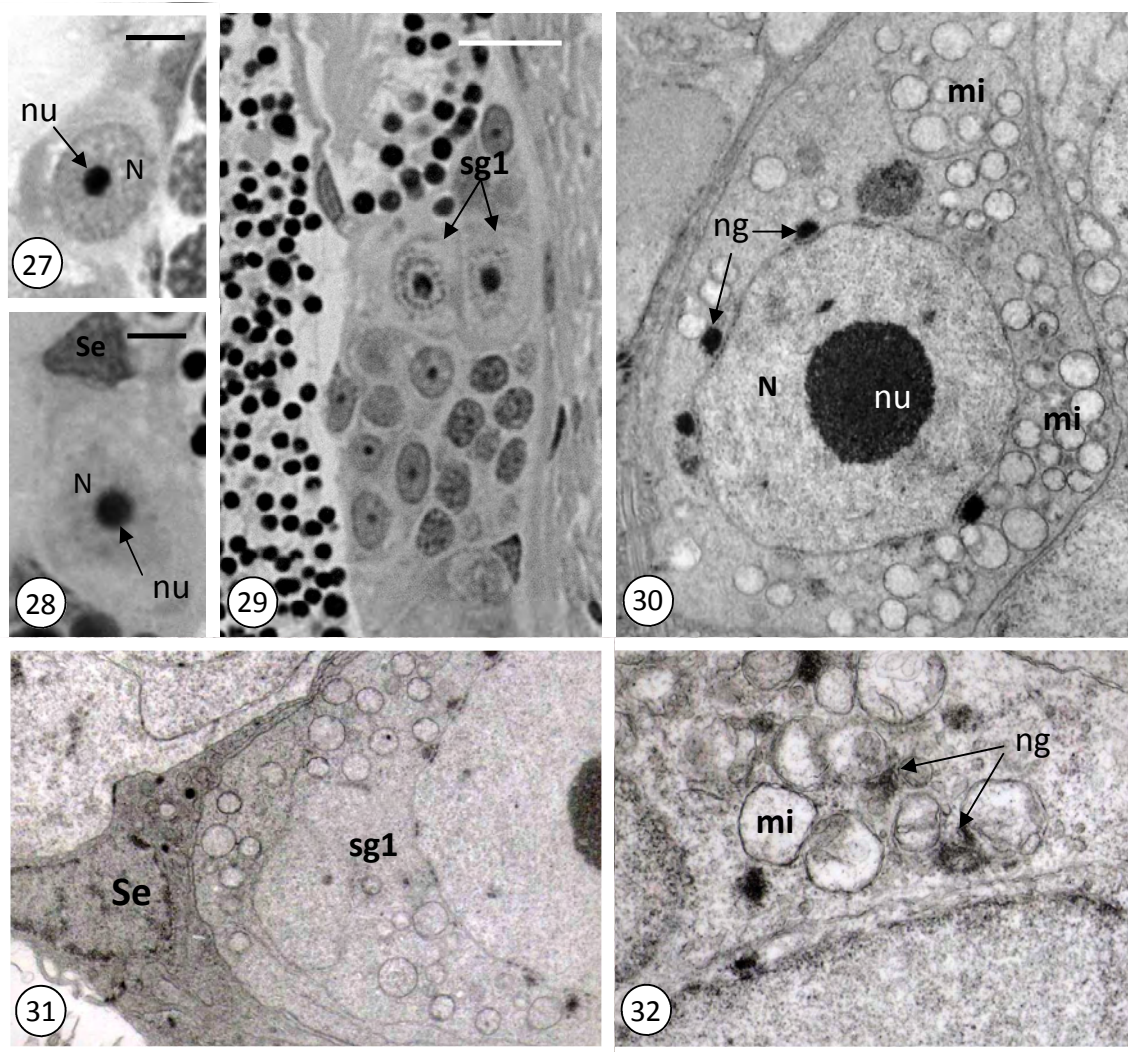
Figuras 27 e 28. Espermatogônias primárias, apresentando: núcleo (N), nucléolo (nu) e células de Sertoli (Se), (barras = 3 μ m; Azul de Toluidina);

Figura 29. Espermatogônias primárias em dupla (sg1), (barra = 10 μ m; Azul de Toluidina).

Figura 30. Eletronmicrografia de espermatogônia primária: núcleo (N), nucléolo (nu), mitocôndrias (mi), nuages (ng), (9.750 X).

Figura 31. Eletronmicrografia de célula de Sertoli (Se) com expansões citoplasmáticas envolvendo uma espermatogônia primária (sg1), (9.750 X).

Figura 32. Detalhe do citoplasma de espermatogônia primária evidenciando: mitocôndrias (mi), nuages (ng), (31.500 X).



Células da linhagem espermatogênica

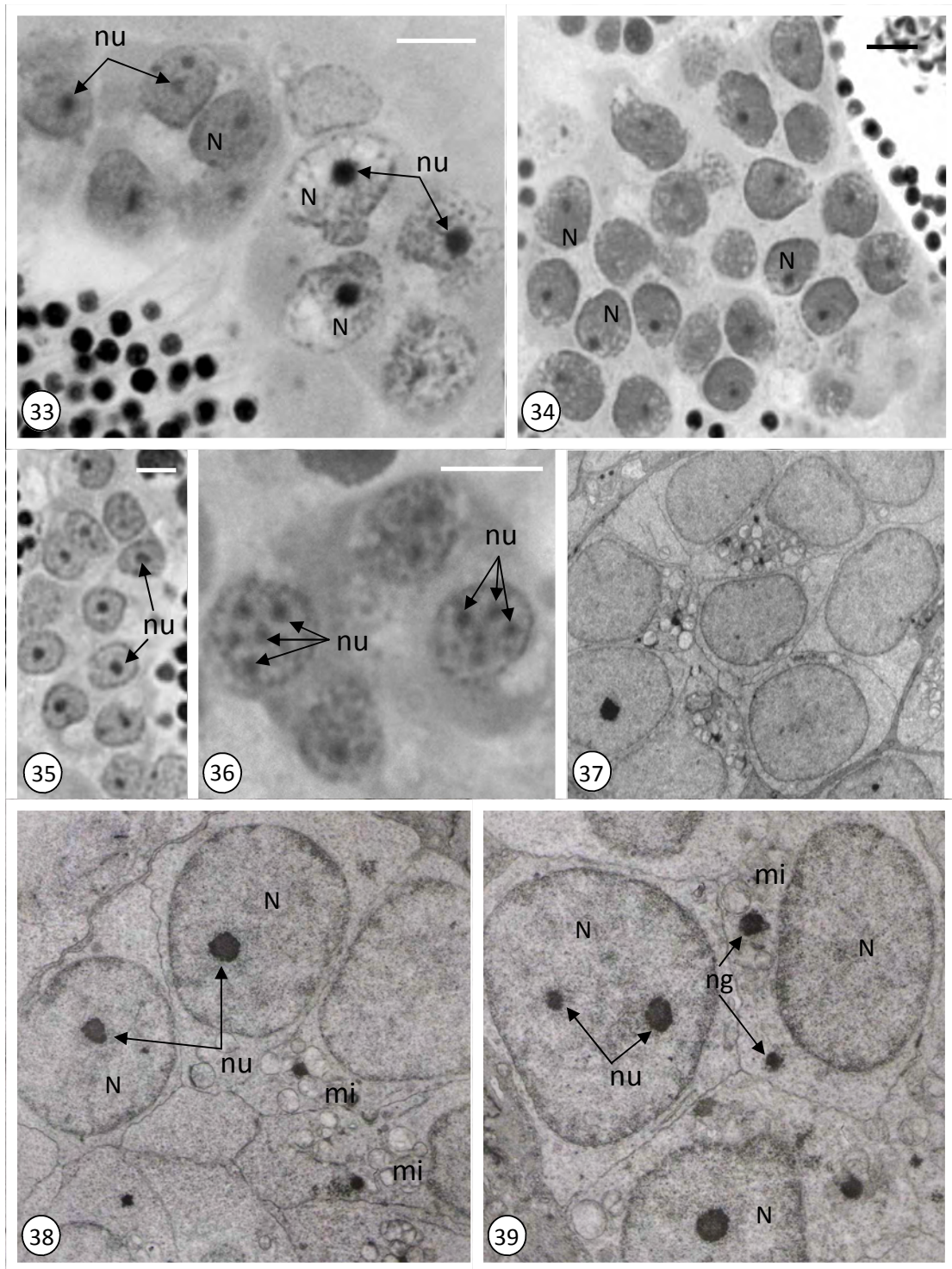
Espermatogônia secundária

Figuras 33, 34 e 35. Cistos de espermatogônias secundárias: núcleo (N) e nucléolo (nu), (barras = 6µm; Azul de Toluidina).

Figuras 36. Cisto de espermatogônias secundárias. Note-se os núcleos apresentando vários nucléolos (nu), (barras = 6µm; Azul de Toluidina)

Figura 37. Eletronmicrografias de transmissão amostrando um cisto de espermatogônias secundárias, (5.750 X).

Figuras 38 e 39. Detalhe das características ultraestruturais de espermatogônias secundárias: núcleo (N), nucléolo (nu), mitocôndrias (mi), nauges (ng), (13.250 X).



Células da linhagem espermatogênica

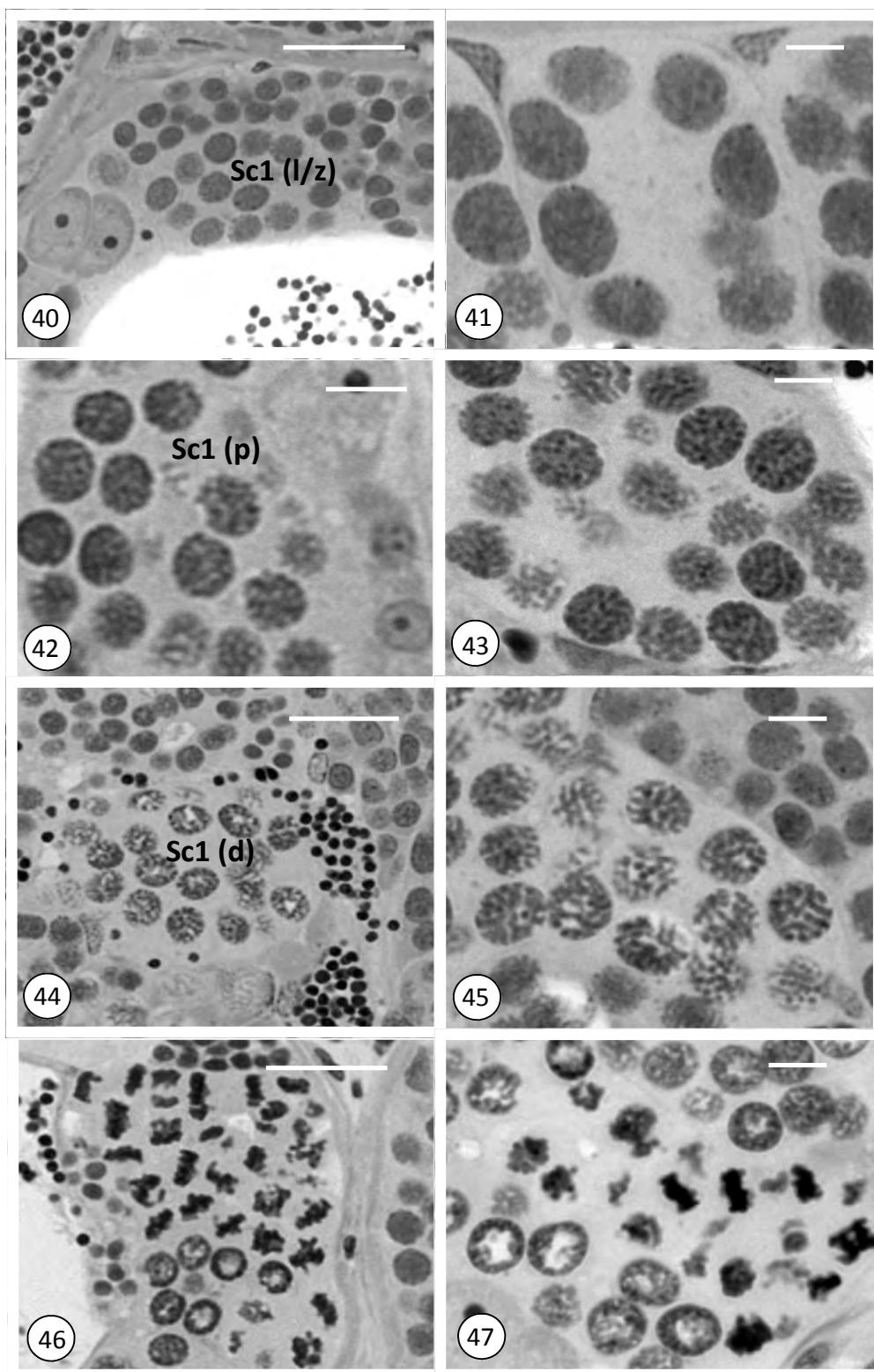
Espermatócitos primários

Figuras 40 e 41. Cistos de espermatócitos primários, na fase de leptóteno / zigóteno (Sc1 (l/z)), (barra em 40 = 20µm; barra em 41 = 6 µm; Azul de Toluidina).

Figuras 42 e 43. Cistos de espermatócitos primários, na fase de paquíteno (Sc1(p)), (barra em 42 = 10µm; barra em 43 = 6 µm; Azul de Toluidina).

Figuras 44 e 45. Cistos de espermatócitos primários, na fase de diplóteno (Sc1(d)), (barra em 44 = 20µm; barra em 45 = 6 µm; Azul de Toluidina).

Figuras 46 e 47. Cistos de espermatócitos primários, na fase de diplóteno / metáfase I. (barra em 46 = 20µm; barra em 47 = 6 µm; Azul de Toluidina).



Células da linhagem espermatogênica

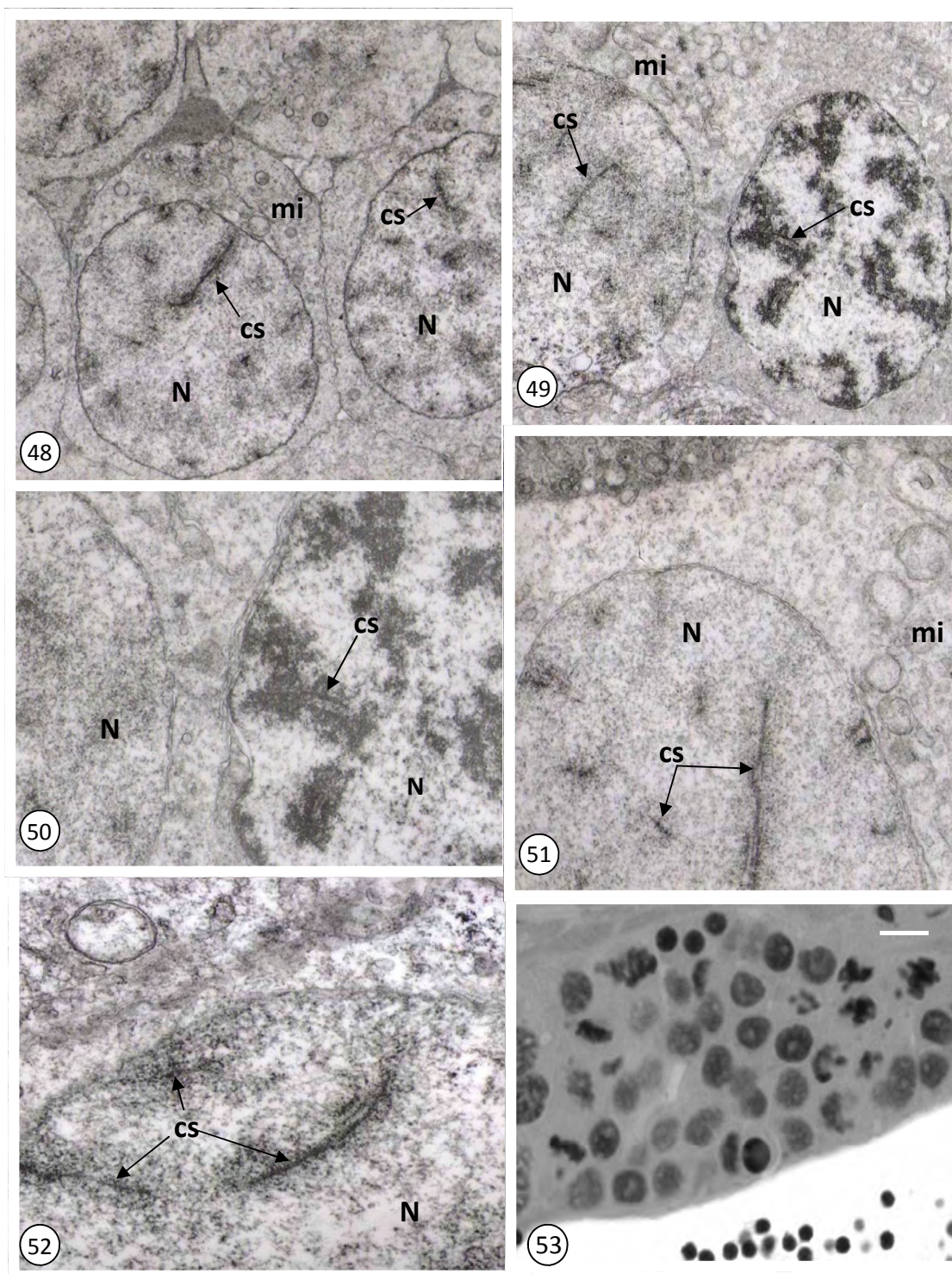
Espermatócitos primários e secundários

Figura 48. Eletronmicrografia de transmissão mostrando espermátocito primário. Observar: núcleo (N), mitocôndrias (mi) e complexos sinaptonêmicos (cs), (9.750 X).

Figuras 49 e 50. Núcleo de espermátocitos primários, com cromatina em diferentes graus de condensação. Observar: (N), mitocôndrias (mi) e complexos sinaptonêmicos (cs), (49 = 9.750X; 50 = 17.000X).

Figura 51 e 52. Núcleo (N) de espermátocitos primários, com detalhe para os complexos sinaptonêmicos (cs). (51 = 17.000X; 52 = 31.500X).

Figura 53. Cisto de espermatócito primários, em divisão para produzir espermátocitos secundários (Barra = 6 µm; Azul de Toluidina).



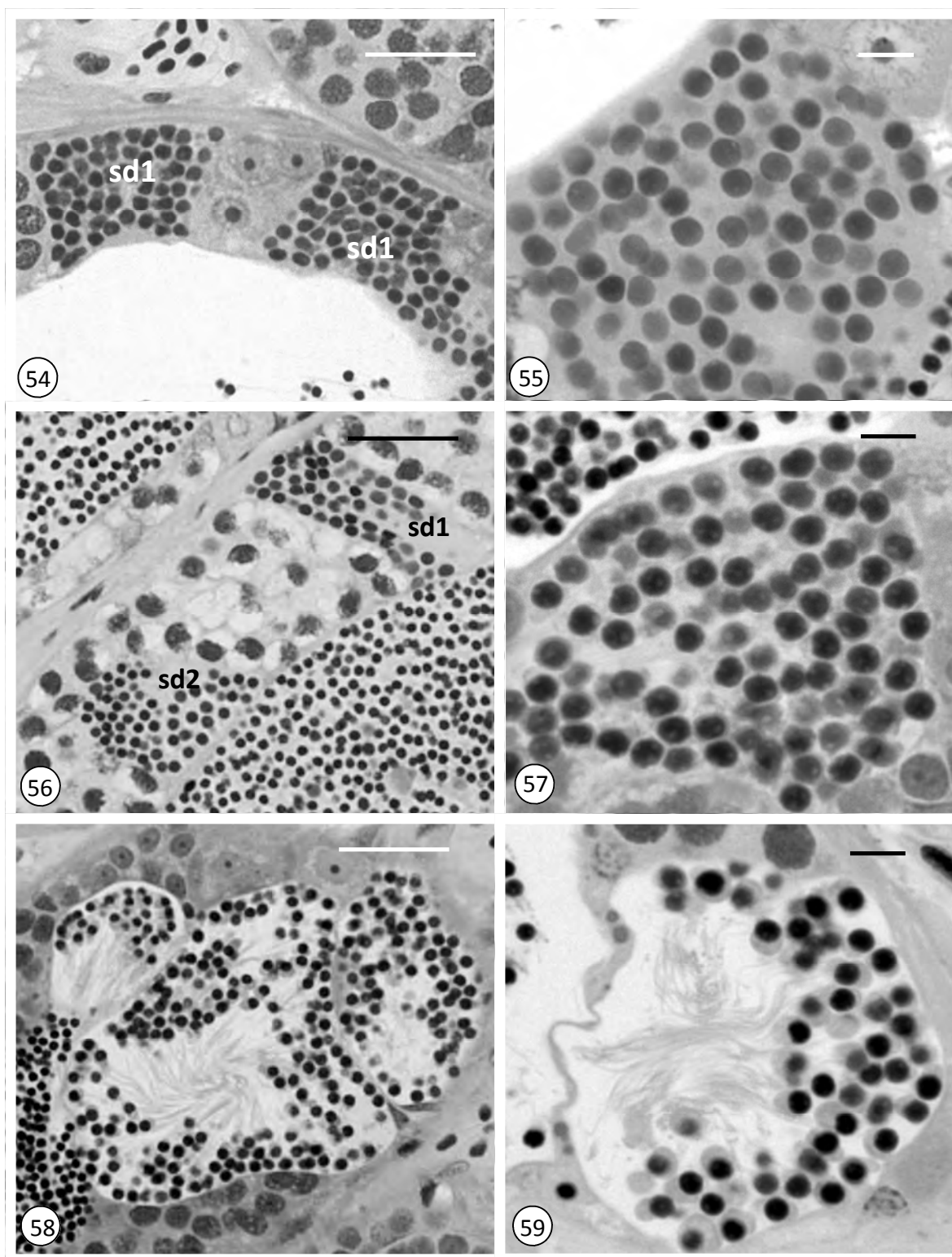
Células da linhagem espermatogênica

Espermátides

Figuras 54 e 55. Cistos de espermátides iniciais (sd1), (barra = 20 μ m; Azul de Toluidina).

Figuras 56 e 57. Cistos de espermátides intermediárias. Note-se a comparação entre um cisto de espermátides iniciais (sd1) e espermátides intermediárias (sd2), (barra em 56 = 20 μ m; barra em 57 = 6 μ m Azul de Toluidina).

Figuras 58 e 59. Cistos de espermátides tardias, (barra em 58 = 20 μ m; barra em 59 = 6 μ m; Azul de Toluidina).



Células da linhagem espermatogênica

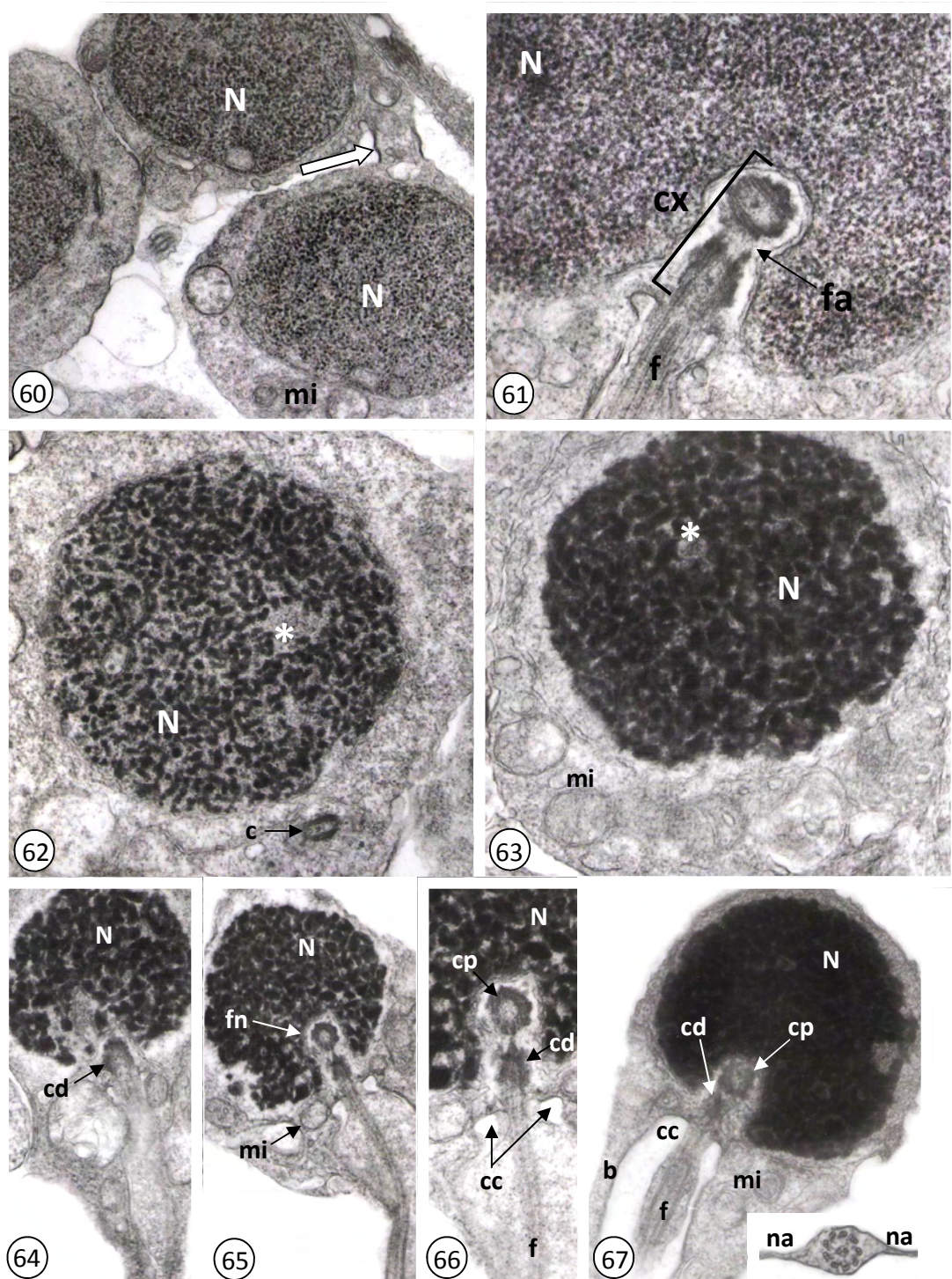
Espermátides e espermatozóides

Figura 60. Eletronmicrografia de transmissão mostrando duas espermátides iniciais conectadas por uma ponte citoplasmática (seta). Núcleo (N), mitocôndrias (mi), (23.000 X).

Figura 61, 62 e 63. Eletronmicrografias de espermátides intermediárias. Note-se os núcleos (N) com maior condensação de cromatina, mas com áreas ainda elétricas (asteriscos), e o complexo centriolar (cx) na fossa nuclear originando o flagelo (f). Fibrilas de ancoragem (fa), centríolo (c), mitocôndrias (mi), (61 = 31.500 X; 62 = 42.000 X; 63 = 57.500 X).

Figura 64, 65 e 66. Detalhe de espermátides tardias, apresentando: Núcleo (N), centríolo distal (cd), fossa nuclear (fn), mitocôndrias (mi), centríolo proximal (cp), centríolo distal (cd), flagelo (f), canal citoplasmático (cc), (64 = 23.000 X; 65 = 31.500 X; 66 = 57.500 X).

Figura 67. Eletronmicrografia de espermatozóide apresentando complexo axonemal, com 9 duplas de microtúbulos periféricos e uma dupla central. Núcleo (N), centríolo proximal (cp), centríolo distal (cd), bainha citoplasmática (b), canal citoplasmático (cc), mitocôndrias (mi), flagelo (f), nadadeiras axonemais (na). (42.000 X).



Células de Sertoli

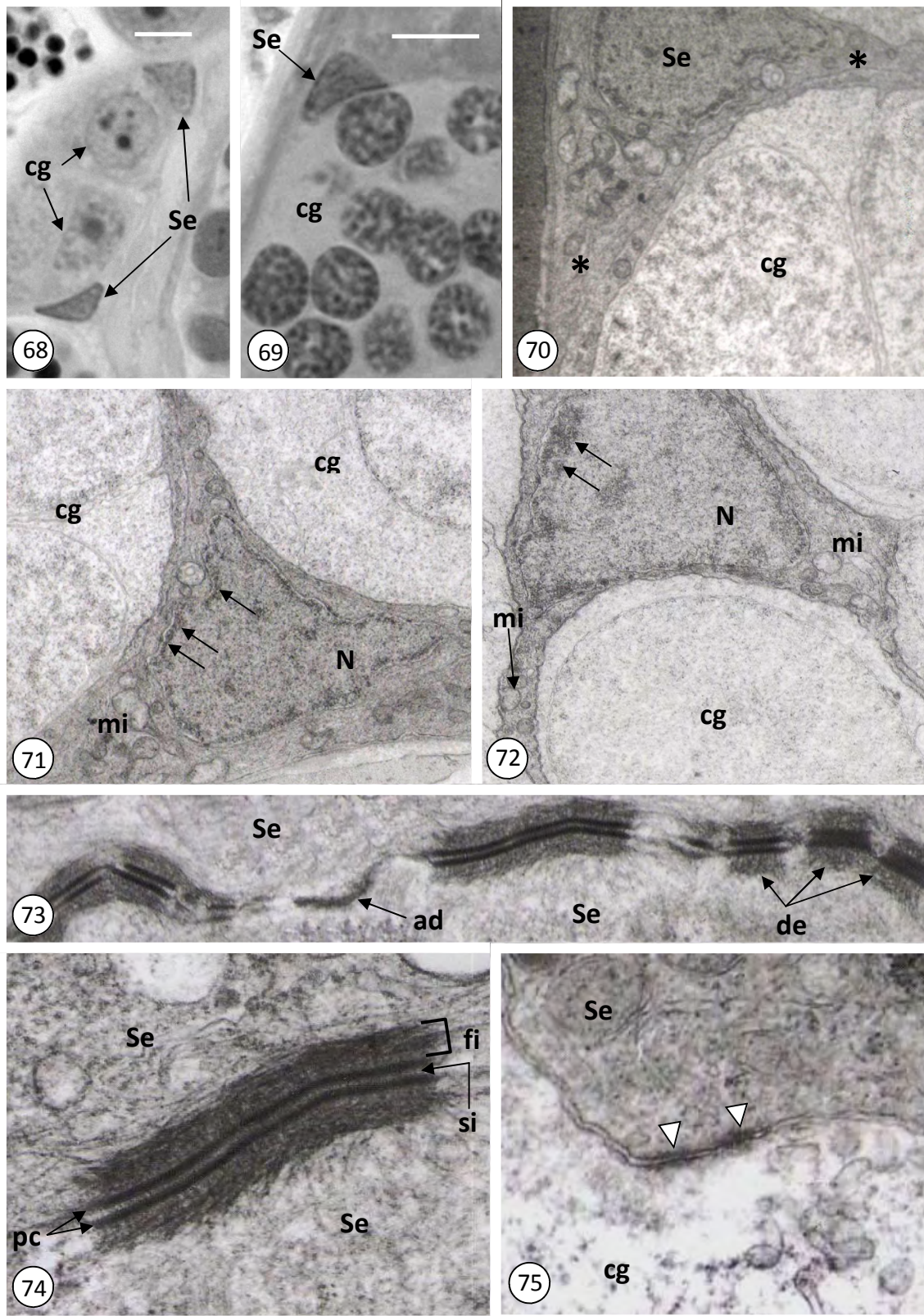
Figuras 68 e 69. Fotomicrografias de células de Sertoli (Se) associadas a células germinativas (cg). Observar os núcleos evidentes e em formato triangular (barras = 6 μ m; Azul de Toluidina).

Figuras 70, 71 e 72. Eletronmicrografias de transmissão destacando os processos citoplasmáticos (asteriscos) envolvendo células da linhagem germinativa (cg). Observar áreas de cromatina mais eletrondensa na parede nuclear (setas). Núcleo (N), mitocôndrias (mi), célula de Sertoli (Se) (13.250 X).

Figura 73. Detalhe das junções celulares do tipo desmossômicas (de) e aderentes (ad) ligando duas células de Sertoli (Se), (31.500 X).

Figura 74. Detalhe de um desmossomo entre duas células de Sertoli. Observar filamentos intermediários (fi) ancorados à placa citoplasmática (pc), e a substância intercelular (si), (57.500 X).

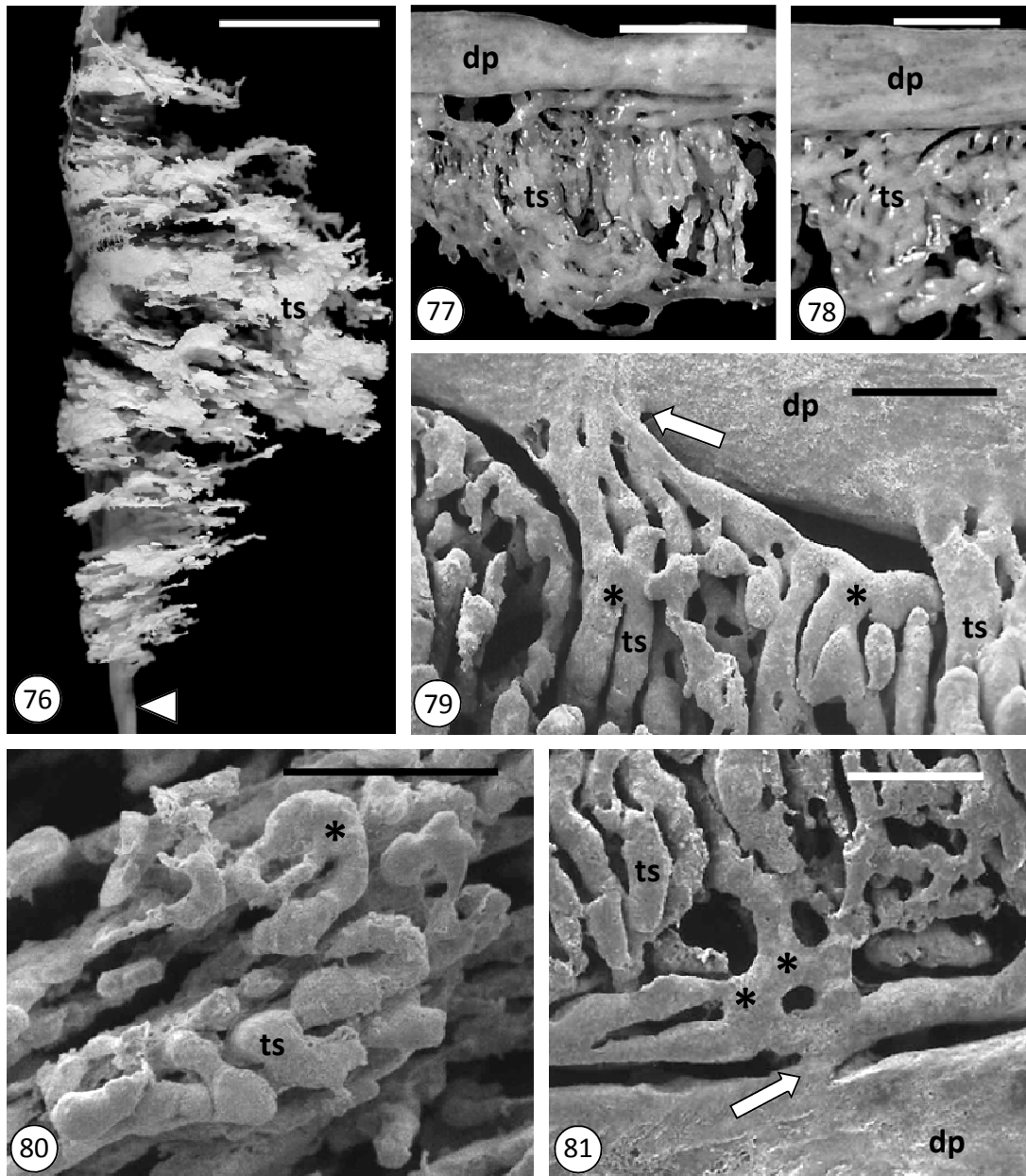
Figura 75. Em detalhe uma junção aderente (cabeças de seta) ligando uma célula germinativa (cg) e uma de Sertoli (Se), (31.500 X).



Sistema de ductos eferentes

Figura 76, 77 e 78. Moldes de segmentos de testículo mostrando: túbulos seminíferos (ts), ducto testicular principal (dp) e ducto espermático (cabeça de seta), (barra em 76 = 5mm; barra em 77 e 78 = 3mm)

Figuras 79, 80 e 81. Microscopia eletrônica de varredura dos moldes. Note-se as anastomoses tubulares (asteriscos) e a confluência direta dos túbulos seminíferos (ts) ao ducto testicular principal (dp) (seta), (barra = 0,5 mm)



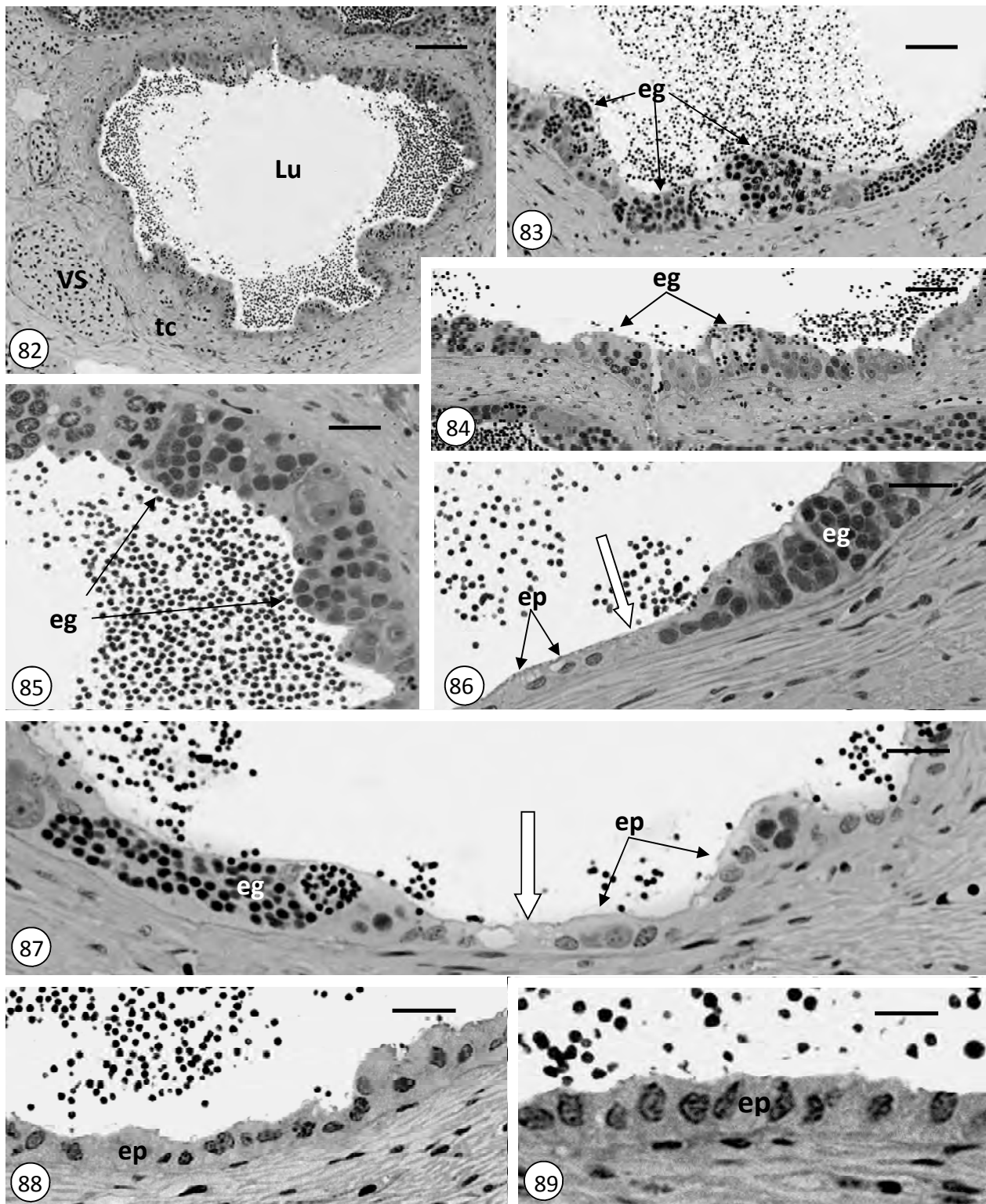
Sistema de ductos eferentes

Figura 82. Fotomicrografia do ducto testicular principal. Destaque para o tecido conjuntivo (tc), contendo vasos sangüíneos (vs) e espermatozóides livres no lúmen tubular (Lu), (barra = 60 μ m; Azul de Toluidina).

Figuras 83, 84 e 85. Epitélio germinativo (eg) na parede do ducto principal testicular, (barra em 83 e 84 = 30 μ m; barra em 85 = 20 μ m; Azul de Toluidina).

Figuras 86 e 87. Transição abrupta (seta) entre o epitélio germinativo (eg) e o epitélio cuboidal de revestimento (ep) do ducto testicular principal, (barra = 20 μ m; Azul de Toluidina).

Figura 88 e 89. Detalhe do epitélio simples cuboidal de revestimento (ep) do ducto testicular principal, (barra em 88 = 20 μ m; barra em 89 = 3 μ m; Azul de Toluidina).



5. *DISCUSSÃO*

5.1 Parâmetros biométricos

O valor de ganho de peso diário de *L. macrocephalus* apresentou-se menor em comparação com o observado em outras espécies reofílicas estudadas em cativeiro. O Matrinxã (*Brycon cephalus*) e o Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) atingem valores médios entre 2,97g/dia - 3,81g/dia (Frasca Scorvo, 1999) e 2,22g/dia - 3,21 g/dia respectivamente (Abimorad, 2004). Estas espécies apresentam um bom desempenho produtivo em condições de cultivo, aproveitando muito bem os lipídios e os carboidratos e poupando proteína para o crescimento (Abimorad, 2004).

Por outro lado, o fator de condição K apresentou uma queda atingindo o valor mínimo no mês de dezembro, coincidindo com o início do período de atividade reprodutiva da espécie. Esta característica que também foi observada em Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Vieira *et al.*, 1999) e Piau branco (*Schizodon knerii*) (Ferreira e Godinho, 1990), difere em espécies como *Leporinus taeniatus* (Thóme *et al.*, 2005), *Pseudoplatystoma coruscans* (Brito e Bazzoli, 2003) e *Pinguipes chilensis* (González e Oyarzún, 2002), onde os valores de fator de condição e IGS apresentaram ao mesmo tempo os valores mais altos do ciclo reprodutivo.

O fator de condição é um indicador quantitativo do grau de bem-estar dos peixes, no que se refere às condições alimentícias recentes ou à condição somática de uma espécie em relação ao meio onde vive (Gulland, 1983). Muitos fatores como o sexo, fase do crescimento, época do ano, localização geográfica, conteúdo estomacal e estado de maturidade sexual, entre outros, interferem na magnitude do fator de condição (Olaya-Neto *et al.*, 2008). No presente estudo, o fator de condição pode ser relacionado como o primeiro

indicador do início da época reprodutiva, atribuindo essa queda de valores ao traslado de nutrientes do corpo para os testículos, preparando os machos para atingirem com sucesso a reprodução nesta época do ano.

5.2 Índices biológicos

Com respeito ao valor médio do IGS no grupo G1, sem tratamento hormonal, o *L. macrocephalus* apresentou o menor valor médio (0,30%) em comparação aos valores apresentados na época reprodutiva, em outras espécies reofílicas, tais como: *Brycon amazonicus* com IGS de 3,2% (Arias *et al.*, 2006), *Brycon opalinus* com IGS de 8% (Gomiero e Braga, 2007), *Brycon cephalus* com IGS de 1,90% (Romagosa *et al.*, 2000), *Leporinus taeniatus* com IGS de 3,29% (Thomé *et al.*, 2005), *Pseudoplatystoma coruscans* com IGS de 1,97% (Brito e Bazzoli, 2003) e *Pseudoplatystoma fasciatum* com IGS de 4,9% (Batlouni *et al.*, 2006).

Por outro lado, o incremento do IGS observado nos grupos G2 (12 horas após primeira dose) e G3 (nove horas após a segunda dose), pode ser atribuído à secreção e liberação de fluído seminal, nos túbulos seminíferos influenciado pela indução hormonal. Segundo Mylonas *et al.* (2010), a maioria dos métodos de indução à espermiacção utilizados na aqüicultura, não estão planejados para induzir a espermatogênese, mas sim a espermiogênese e a produção do fluído seminal, que vai permitir que um grande número de espermatozóides sejam direcionados aos ductos testiculares principais. O incremento no volume seminal após diversos tratamentos hormonais tem sido observado em: *Prochilodus scrofa*, induzido com gonadotropina coriônica humana (hCG) (Kavamoto *et al.*, 1998) e *Gadus morhua*, induzido com ovaplant^R (Garber *et al.*, 2009).

Por outro lado, a relação inversamente proporcional e hormônio-dependente entre o IGS e os índices hepatossomático e viscerossomático, estariam indicando um desvio de energia do fígado e vísceras, em direção às gônadas, orientada para a produção e liberação de gametas, mediante os processos espermatogênicos. Este direcionamento da energia corporal tem sido muito pouco estudado em machos de peixes, e mais ainda, nenhuma literatura sobre o papel da indução hormonal no traslado de energia foi encontrado. Desta forma, é possível sugerir, como um resultado inédito, que a indução hormonal propiciou um desvio de energia da parte somática dos indivíduos para as gônadas.

5.3 Estrutura testicular e espermatogênese

Macroscopicamente, o sistema reprodutor masculino de *L. macrocephalus* segue o padrão anatômico descrito para a maioria dos teleósteos: com testículos pares e alongados sem a presença de estruturas acessórias. Peixes como *Schizodon knerii* (Ferreira e Godinho, 1990), *Thalassoma bifasciatum* (Koulish, et al., 2002), *Brycon siebenthalae* (Arias et al., 2004), *Leporinus taeniatus* (Thomé et al., 2005), *Brycon orthotaenia* (Gonçalves et al., 2006), *Corydoras spp.* (Mazzoldi et al., 2007) e *Cottus kazika* (Tahara et al., 2010), pertencentes à Divisão Teleostei, compartilharam estas características. Por outro lado, o presente trabalho, também permitiu corroborar com os relatos anteriormente descritos por Amaral e Vicentini (2001), diferindo apenas nas diferenças morfológicas observadas entre as regiões cranial, média e caudal, quanto ao volume testicular.

Por outro lado, a análise histológica dos testículos permitiu classificá-lo como tubular anastomosado espermatogonial irrestrito, similarmente ao observado para *Barbus kahajanii*, *Notemigonus crysoleucas*, *Notropis hypselopterus*, *Gymnocorymbus ternetzi*,

Oncorhynchus kisutch (Grier, 1980a), *Schizodon knerii* (Alves e Godinho, 1987), *Dorosoma petense*, *Opisthonema oglinum*, *Ictalurus natalis*, *Esox lucisu*, *Esox Níger* (Grier, 1993), *Prochilodus scrofa* (Vicentini *et al.*, 2001) *Pimelodus maculatus* (Oliveira-Junior, 2003), *Salminus maxillosus* (Veríssimo-Silveira, 2003), *Leporinus taeniatus* (Thomé *et al.*, 2005), *Salminu hilari* (Takahashi, 2006) e *Brycon henni* (Montoya-López *et al.*, 2006). Este tipo de estrutura testicular é característico dos osteíctes, evolutivamente basais que incluem todas as taxas “primitivas” de teleósteos (Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe, 2009).

A ocorrência de espermatozóides dentro de cistos germinativos permite afirmar que *L. macrocephalus* apresenta espermatogênese do tipo cística, juntamente com as demais espécies da família Anostomidae. Característica que também é observada nas famílias Parodontidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Chilodontidae, Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestidae, Gasteropelecidae, Acestorhynchidae, Cynodontidae, Erythrinidae e Lebiasinidae (Veríssimo-Silveira, 2007).

Com respeito à descrição realizada, referente à morfologia dos diferentes tipos de células germinativas, os resultados encontrados foram similares aos descritos para machos de *Brycon hillari* (Zaiden, 2000), *Bryconos affinis* (Andrade *et al.*, 2001), *Pimelodus maculatus* (Oliveira Junior, 2003), *Oreochromis niloticus* (Vilela *et al.*, 2003) e *Gymnotus carapo* (Cognato e Bernhardt, 2006). Em todas as espécies anteriormente citadas, as espermatogônias primárias diferenciadas são circundadas por expansões citoplasmáticas das células de Sertoli, independente da fase ou estágio do ciclo reprodutivo em que se encontram. No citoplasma das espermatogônias primárias e secundárias foi freqüente encontrar “nuages”, que podem apresentar-se livres ou associadas às mitocôndrias e perto da membrana nuclear.

As estruturas conhecidas como “lamella annulate”, componentes citoplasmáticos comumente presentes nas células germinativas masculinas em peixes (Pudney, 1995), não foram observadas em nenhum dos grupos de estudo. Pontes citoplasmáticas, resultantes da citocinese incompleta e responsáveis pelo desenvolvimento sincrônico das células germinativas nos cistos, são comumente observadas em espermatogônias primárias e secundárias (Selman e Wallace, 1986), mas em *L. macrocephalus* somente foram observadas em cisto de espermatídes iniciais.

As divisões meióticas, da espermatogênese, caracterizam-se pela presença de espermatócitos primários e secundários. Segundo Billard (1984), os espermatócitos primários são células que apresentam estruturas nucleares mais complexas do que as espermatogônias, com a formação de grumos de cromatina e complexos sinaptonêmicos. Estes complexos são estruturas protéicas envolvidas no alinhamento de cromossomos homólogos, durante a troca genética. Os espermatócitos primários, em todas as suas fases de desenvolvimento, são similares aos descritos para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Schulz *et al.*, 2005) e zebrafish (*Danio rerio*) (Leal *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009).

As principais modificações morfológicas ocorridas nas espermatídes de *L. macrocephalus* durante o período da sua diferenciação são: compactação da cromatina, migração das mitocôndrias e dos centríolos, formação da peça intermediária, desenvolvimento do flagelo, e eliminação de citoplasma. As mesmas características têm sido descritas na literatura para outras espécies de Characiformes como *Brycon siebenthalae* (Arias *et al.*, 2004), *Salminus maxillosus* (Veríssimo-Silveira, 2003),

Gymnocorymbus ternetzi, *Hypessobrycon bifasciatus* e *Hyphessobrycon eques* (Prieto, 2007).

Os espermatozóides em peixes são bastante divergentes na forma e estrutura, sendo classificado de aquasperma e introsperma, caracterizando a fertilização externa e interna, respectivamente (Jamieson, 1991). Devido à estratégia reprodutiva adotada pela espécie *L. macrocephalus*, de fertilização externa, é possível classificar os seus espermatozóides, como aquasperma. No presente trabalho foi observada a ausência de acrossoma nos espermatozóides e a presença de um único flagelo, que o classifica no tipo mais comum de espermatozóides encontrados em Neopterygii e, conseqüentemente, nos teleósteos, denominados de espermatozóides aquasperma uniflagelado anacrossomal (Jamieson, 1991). Este tipo específico é encontrado também em *Apareidono affinis*, *Psectrogaster essquibens*, *Prochilodus lineatus*, *Abramites sp.*, *Characidium gomesi*, *Anodus elongatus* (Veríssimo-Silveira, 2007), *Leporinus friderei*, *Leporinus lacustris*, *Abramites sp.*, *Schizodon isognatus*, *Schizodon nasutus*, e *Schizodon sp.* (Burns et al., 2009).

Dentro da ordem Characiformes, a maioria dos espermatozóides possuem um flagelo constituído pelo axonema clássico (9+2) (Veríssimo-Silveira, 2003; Prieto, 2007). Em alguns Otophysi, os flagelos podem apresentar um compartimento túbulo-vesicular ou ainda projeções alares da membrana flagelar, característica observada em *L. macrocephalus* e similar ao encontrada em *Abramites sp.*, *Leporinus lacustris*, *Caenotropus labyrinthicus*, *Raphiodon vulpinus* (Veríssimo-Silveira, 2007) e *Schizodon spp.* (Burns et al., 2009). Segundo Lee e Kim (2001), a ausência de projeções alares é uma característica comum às ordens Characiformes e Siluriformes. Entretanto, a presença dessas projeções em alguns Siluriformes da família Bagridae (Lee e Kim, 1999) e em *L. macrocephalus*, um

Characiforme da família Anostomidae, reforçaria o mencionado por Veríssimo-Silveira (2007), indicando que este carácter não pode ser utilizado para correlacionar estas duas ordens.

Quanto às células de Sertoli, existem considerações na literatura indicando que fagocitam os corpos residuais, nutrem os espermatozóides, formam cistos germinativos e ductos eferentes (Mitsuiki, 2002). Em *L. macrocephalus*, foi possível observar como as células de Sertoli são as responsáveis pelo empacotamento dos cistos espermatogênicos, graças ao desenvolvimento de junções celulares específicas, do tipo aderente e desmossômicas. Segundo Batlouni *et al.* (2005; 2009), estas junções celulares, encontradas no epitélio germinativo podem estar envolvidas na manutenção da organização celular e da estrutura cística, enquanto que as do tipo Gap (não observadas neste estudo) estariam envolvidas no desenvolvimento sincrônico e na comunicação entre as células do mesmo cisto. Estas junções também têm sido observadas no epitélio germinativo de *Pseudoplatystoma fasciatum* (Batlouni *et al.*, 2005), *Gymnocorymbus ternetzi*, *Hypessobrycon bifasciatus*, *Hyphessobrycon eques* (Prieto, 2007) e *Phalloceros caudimaculatus* (Vicentini *et al.*, 2010).

5.4 Sistema de ductos eferentes

O sistema de ductos eferentes, nas gônadas masculinas de teleósteos, consiste de: ductos eferentes testiculares, ducto testicular principal e ductos espermáticos (Grier *et al.*, 1980; Lahnsteiner *et al.*, 1993b; Lahnsteiner *et al.*, 1994; Lahnsteiner e Patzner, 2009). A via seminífera de *L. macrocephalus*, em geral, é similar ao descrito para alguns Cyprinidae (Lahnsteiner *et al.*, 1994) e Prochilodontidae (Vicentini *et al.*, 2001), onde os túbulos

seminíferos esvaziam seu conteúdo diretamente no ducto testicular principal em ambos testículos. Esta característica difere daquela observada em Salmonidae e Esocidae (Lahnsteiner *et al.*, 1993a, 1993b). Nesse caso, os ductos eferentes testiculares representam um estágio transicional, entre os ductos seminíferos e os ductos testiculares principais.

As paredes do ducto testicular principal e do ducto espermático consistem de três camadas: uma de peritônio, uma camada de tecido conjuntivo contendo células de músculo liso e um epitélio de revestimento (Lahnsteiner *et al.*, 2003; Lahnsteiner e Patzner 2009). Similar a outros teleósteos, três camadas foram observadas em *L. macrocephalus*. No entanto, nesta espécie, o epitélio do ducto testicular principal foi caracterizado como cuboidal simples, e vasos sanguíneos foram freqüentemente observados, dentro da camada média. De acordo com Walter *et al.* (2005), mudanças na espessura do epitélio de revestimento do ducto testicular principal foram observadas no Cyprinidae *Leuciscus cephalus*, durante a série de fases reprodutivas, desde pré-desova até pós-desova. Durante a fase de pré-desova e pós-desova as células do epitélio de revestimento são do tipo escamoso/cuboidal, porém ocorre uma mudança no epitélio para o tipo colunar, durante a fase de desova (Walter *et al.*, 2005). De acordo com Lahnsteiner *et al.* (1994), Lahnsteiner (2003), Lahnsteiner e Patzner (2009) e Walter *et al.* (2005), os ductos testiculares principais e ductos espermáticos, em teleósteos, apresentam as seguintes funções: armazenamento e nutrição dos espermatozóides, síntese de esteróides e proteínas, atividades de fagocitose e formação de um gradiente iônico no fluído seminal.

5.5 Parâmetros seminais

O baixo volume de sêmen produzido em *L. macrocephalus* (0,45 ml) após duas doses de hormônio coincide com o valor obtido por Ribeiro e Godinho (2003) usando

Conceptal como tratamento hormonal, em uma única dose de 0,5 ml/Kg de reprodutor. Nesse caso, o baixo volume de sêmen obtido por massagem da parede celômica levou ao sacrifício dos reprodutores e a retirada de seus testículos para uma coleta direta do sêmen, técnica muito utilizada nesta espécie, e único caminho para a obtenção de maior quantidade de gametas masculinos. Em comparação com espécies do mesmo gênero como *Leporinus obtusidens* (0,9 ml) (Murgas *et al.*, 1999) e *Leporinus elongatus* (1,0 ml) (Carvalho, 2001), o *L. macrocephalus* apresentou o menor volume de sêmen após tratamento hormonal.

A concentração espermática média do sêmen de *L. macrocephalus* ($6,09 \times 10^9$ spz mL⁻¹), observadas no presente estudo, evidencia valores maiores do que aqueles reportados por Moraes (2004) ($4,4 \times 10^9$ spz mL⁻¹), e menores do que os encontrados por Streit Jr *et al.* (2003) ($13,2 \times 10^9$ spz mL⁻¹). Embora o valor observado neste trabalho, não seja um dos mais altos entre as espécies nativas, peixes como a piapara *Leporinus elongatus* (7 a 16×10^9 spz mL⁻¹), pacu-caranha, *Piaractus mesopotamicus* (7,1 a $11,1 \times 10^9$ spz mL⁻¹) e dourado *S. maxillosus* ($4,3$ a 10×10^9 spz mL⁻¹) (Godinho e Cóser, 1995), apresentam valores semelhantes aos observados em *L. macrocephalus*. Já espécies como o curimatã-pacu, *Prochilodus marggravii* (19×10^9 spz mL⁻¹) (Bedore *et al.*, 1997), curimbatá, *Prochilodus lineatus* ($10,6 \times 10^9$ spz mL⁻¹) (Fransciscato *et al.*, 2002) e pacu, *Piaractus mesopotamicus* ($18,62 \times 10^9$ spz mL⁻¹) (Miliorini *et al.*, 2002), se destacam como peixes que apresentam elevado conteúdo de espermatozóides por ml de sêmen produzido.

Por outro lado, a motilidade espermática em peixes de água doce e em peixes marinhos é parcialmente controlada pela pressão osmótica. Em peixes dulciquícolos, a água tem uma baixa osmolaridade, em comparação com o plasma seminal, assim, ocorre um choque hiposmótico que gera um sinal inicial para os eventos, que conduzem à ativação dos

espermatozóides, e que na maioria dos peixes de água doce tem um período de duração entre 30 e 40 segundos (Tabares *et al.*, 2005). O choque hiposmótico produz uma resposta celular, resultando na ativação da motilidade flagelar das células espermáticas e também um incremento do pH intracelular, alterado pelo incremento ou diminuição da concentração iônica (Schulz *et al.*, 2009). No presente estudo, a motilidade espermática de *L. macrocephalus* foi em média de 56s, e embora não fosse possível encontrar comparações desta análise para a mesma espécie, este resultado foi igual ao reportado para *L. elongatus* (Carvalho, 2001) e *Brycon orbignyianus* (Murgas *et al.*, 2004). Espécies como *L. obtusidens* (Murgas *et al.*, 1999), *P. mesopotamicus* (Maria *et al.*, 2004) e *Prochilodus lineatus* (Cruz, 2001), com 216s, 486s, e 111s, respectivamente, apresentam os maiores tempos de ativação entre as espécies nativas de interesse na aquicultura nacional.

Finalmente, o índice de sobrevivência espermática analisado, pelo processo de coloração eosina-negrosina, demonstrou que os 96% dos espermatozóides vivos de *L. macrocephalus* foram semelhantes aos 97,5%, 96,6% e 94,1% encontrados em *Brycon orbignyianus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii*, respectivamente (Prieto, 2004).

Como se pode observar, a grande variação entre os diferentes parâmetros podem ser explicadas pela variabilidade genética entre os diferentes gêneros e espécies, seja pela incidência da época de coleta do sêmen, pelo manejo de manutenção dos reprodutores, e pelas condições ambientais da região em que os dados foram coletados (Moraes, 2004), ou ainda, pelas características evolutivas e ecológicas das espécies e ao seu desenvolvimento em habitats novos e completamente diferentes aos naturais.

5.6 Epitélio germinativo

Com respeito ao aumento hormônio-dependente nas áreas do túbulo seminífero e do lúmen tubular, é possível sugerir que esta característica se deve ao rápido incremento de espermatozóides liberados, desde os cistos à luz do túbulo, após os tratamentos hormonais. Segundo Mylonas *et al.* (2010), os métodos de indução hormonal usados na aquicultura, estão planejados para induzir a produção do fluído seminal e a espermiogênese, permitindo que um grande número de espermatozóides sejam liberados desde os espermatocistos à luz tubular.

Os processos espermatogênicos estão regulados pelas gonadotropinas, através da produção de androgênios no testículo, especificamente do 11-ketotestosterona (11-KT) (Schulz *et al.*, 2009). Este androgênio, sintetizado fora do túbulo seminífero, pelas células de Leydig, exerce a sua atividade biológica no interior do túbulo por meio de ligações com os receptores de androgênio presentes nas células peritubulares mióides e células de Sertoli (Schulz e Miura 2002). Desta forma, ao serem estimuladas pelo 11-KT, as células de Sertoli induzem o desenvolvimento dos processos espermatogênicos e espermiogênicos nas células germinativas que suportam.

Neste contexto, é importante enfatizar que a hipofiseção é realizada usando extrato de hipófise de animais sexualmente maduros, devido ao fato de que nesta época do ano o acúmulo de hormônios gonadotrópicos (GtH) (principalmente hormônio luteinizante, LH) na hipófise, é o mais elevado de todo o ciclo reprodutivo (Valdebenito, 2008). Desta forma, nos animais hipofisados, o papel do LH exógeno é induzir a produção do 11-KT pelas células de Leydig, acelerando os processos espermiogênicos nas células germinativas,

finalizando com um incremento na produção de espermatozóides e um grande acúmulo deste tipo celular na área do lúmen tubular.

Com relação ao número e frequência dos cistos espermatogênicos de espermatogônias secundárias (sg2), espermátócitos primários, na fase de paquíteno (sc1(P)), espermátócitos primários, na fase de diplóteno (sc1(D)), espermátócitos secundários (sc2) e espermátides iniciais (sd1), ao longo dos tratamentos hormonais, não foi possível observar uma relação direta com as doses aplicadas nos diferentes grupos. Como esperado, pelo curto período de análise, as variações no número e na frequência dos cistos espermatogênicos somente seriam visíveis após vários dias do tratamento hormonal.

Segundo Nóbrega *et al.* (2009), o conhecimento da duração da espermatogênese é muito usado para entender a biologia reprodutiva dos organismos, em particular para compreender os mecanismos funcionais e reguladores da espermatogênese e as estratégias reprodutivas. De acordo com a literatura, a duração da espermatogênese, desde pré-leptóteno até espermatozóides, é de 12 dias para o medaka, *Oryzias latipes*, 14,5 dias para guppy, *Poecilia reticulata*, 21 dias para *Poecilia shenops*, 14 dias para *Onchorynchus mykiss* e 6 dias para zebrafish, *Danio rerio* (Leal *et al.*, 2009; Nóbrega *et al.*, 2009).

Por outro lado, variações no epitélio germinativo somente têm sido registradas usando outros tipos de tratamentos hormonais. Estudos realizados com implantes de análogos do hormônio liberador de gonadotropina (GnRHa) em *Siganus guttatus*, apresentaram diferenças entre os estágios de maturação gonadal (em relação ao controle) após 74 dias da implantação dos pellets hormonais (Komatsu *et al.*, 2006). Em *Morone saxatilis*, o tratamento a longo prazo com várias doses de GnRHa e testosterona (T)

demonstrou variações nos tipos de células germinativas entre o grupo controle (exclusivamente com espermatogônias) e os grupos tratados (com cistos de espermatócitos e espermatozóides) após 150 dias do início do experimento (Holland *et al.*, 2002).

Com respeito ao aumento drástico de espermatócitos primários, na fase de leptóteno/zigóteno (sc1(l/z)), observados após a primeira dose hormonal, é possível sugerir que este resultado está relacionado com o estágio dos indivíduos, no momento do experimento e não com a indução hormonal. Isto é, possivelmente, os animais do grupo G2 estariam com a maior quantidade destes cistos mesmo antes da indução hormonal.

A diminuição nas frequências dos cistos de espermátides intermediárias (sd2) e espermátides finais (sd3), sugerem que o uso dos indutores para a espermiacção altera a espermiogênese, transformando rapidamente as espermátides em espermatozóides. Esta característica, corrobora ao mencionado por Mylonas *et al.* (1997, 2010), os quais sugerem que o uso de hormônios para a indução à reprodução induzem a espermiogênese, permitindo assim uma maior quantidade de espermatozóides livres no lúmen tubular. Na espécie *Prochilodus scrofa*, este comportamento dos cistos germinativos também foi observado após a indução hormonal com gonadotropina coriônica humana (Kavamoto *et al.*, 1998).

Em relação ao incremento observado do número de espermatogônias primárias (sg1) após duas doses de hormônio, se deve possivelmente à facilidade na observação deste tipo celular, após o rompimento dos cistos maduros de espermátides e espermatozóides. Ou também, como no caso de (sc1(l/z)), os animais do grupo G3 estariam com maior quantidade deste tipo celular, mesmo sem aplicação de hormônio. Como foi discutido

anteriormente, as variações nas frequências dos cistos espermatogênicos, e neste caso em particular, na quantidade de sg1 por meio da indução hormonal, só podem ser observadas vários dias depois dos tratamentos hormonais.

Um outro aspecto importante a ser destacado são as características ultraestruturais encontrados nos espermatozóides de *L. macrocephalus*. Comparado com outras espécies reofílicas com fecundação externa, os espermatozóides de piau apresentaram um elevado número de mitocôndrias e uma porção média robusta quando se considera a morfologia destas células, com outras espécies reofílicas (Arias *et al.*, 2004; Batlouni *et al.*, 2006; Veríssimo-Silveira, 2007). Esta característica, aliada à presença de nadadeiras axonemais laterais nos flagelos, sugerem que estas células nadam com bastante vigor e apresentam provavelmente eficiência elevada.

Por outro lado, o incremento hipófise dependente no número de túbulos seminíferos com epitélio germinativo descontínuo, tem relação direta com um aumento no rompimento dos cistos e a subsequente liberação dos espermatozóides ao lúmen tubular; assim sendo, é provável que as áreas onde os cistos de espermatozóides foram rompidos são as áreas descontínuas do epitélio germinativo. Como foi mencionado anteriormente, o processo de hipofisação induz a liberação de espermatozóides dos cistos espermatogênicos para a luz do túbulo. Desta forma, é possível sugerir que o papel da indução hormonal no rompimento dos cistos, está relacionado com o aumento interno do volume dos cistos espermatogênicos, quebrando as junções celulares, entre as células de Sertoli, no momento que atingem a sua maior capacidade de suporte. Esse rompimento dos cistos maduros estaria refletido também no incremento da concentração espermática, após os tratamentos hormonais. Estudos realizados em Pacú, *Piaractus mesopotamicus*, Curimbatá, *Prochilodus scrofa*, Cachama

branca, *Piaractus brachypomus* e Liseta, *Leporinus muyscorum* apresentaram um aumento na concentração espermática, após a indução hormonal (Streit *et al.*, 2006; Kavamoto *et al.*, 1996; Fresneda *et al.*, 2004; Arguello *et al.*, 2001).

De um modo geral, as características anatômicas, a espermatogênese e a evolução do processo de espermição no piau após indução hormonal não estão diretamente relacionadas com o baixo volume de sêmen liberado pela espécie. Quando comparado com outras espécies reofílicas, *L. macrocephalus*, pode ser considerada uma espécie oligospermica, isto é, que produz e libera relativamente uma quantidade reduzida de espermatozoides. Neste contexto, apesar dos valores de concentração espermática serem similar à de outras espécies nativas, o volume de sêmen liberado é muito inferior, resultando num número absoluto final de espermatozoides relativamente baixo.

A hipótese que o baixo volume de sêmen produzido nesta espécie pudesse ser compensado por uma elevada concentração espermática não foi confirmada. Espécies como *P. lineatus* com número total de espermatozoides de $23,32 \times 10^9$ em 2,2 ml de sêmen, *P. mesopotamicus* com número total de espermatozoides de $96,82 \times 10^9$ em 5,2 ml de sêmen e *L. elongatus* com número total de espermatozoides de $28,8 \times 10^9$ em 1,8 ml de sêmen, são espécies que possuem um alto valor total de espermatozoides em comparação com *L. macrocephalus*, que para este trabalho teve um valor total de $2,74 \times 10^9$ espermatozoides em 0,45 ml de sêmen.

O líquido seminal é produzido nos testículos normalmente por secreções de células de Sertoli e das células que formam os ductos testiculares (Schulz *et al.*, 2009; Lahnsteiner e Patzner, 2009). Nesta espécie, indubitavelmente, o líquido é produzido em pouca

quantidade, fator que reflete diretamente no volume de sêmen liberado. Em *L. macrocephalus* não foram encontradas glândulas anexas ou outras estruturas que pudessem reter o sêmen, no momento da espermição, e que pudessem ser responsabilizadas pela retenção deste líquido.

Por outro lado, podemos dizer que a espécie responde positivamente ao tratamento hormonal, evidenciado pelo aumento do IGS; pela dilatação dos túbulos seminíferos; e pela descontinuidade progressiva do epitélio germinativo, ao longo do tratamento hormonal. Em outra vertente, é sabido que o principal fator que controla a produção quantitativa de espermatozoides em peixes é o número de divisões que as espermatogônias sofrem antes de se tornarem espermatócitos primários (Nóbrega *et al.*, 2009). Já foi demonstrado que o número de divisões espermatogonial pode ser maior nas espécies com maior taxa de produção de espermatozoides (Schulz *et al.*, 2009). Desta forma, é possível que no piauí o número de divisões espermatogoniais seja reduzido, aspecto que poderia ser elucidado em futuras abordagens.

Apesar da ausência de documentação científica, alguns relatos de produtores indicam que a reprodução induzida do piauí pode apresentar melhores resultados quando a prática de indução semi-natural é utilizada. Nesta prática, machos e fêmeas induzidos são colocados em caixas circulares com fluxo contínuo de água e reproduzem-se sem necessidade de extrusão, ou seja, os casais liberam os gametas à própria vontade. Neste método, os casais são induzidos de forma similar ao método aqui aplicado (fertilização a seco), mas liberam os gametas sem necessidade de extrusão. As taxas de fertilização relatadas empiricamente são bastante altas (entre 90 e 100%). Desta forma, o reduzido

volume de sêmen produzido e liberado pelos machos é suficiente para fecundar os ovócitos liberados pelas fêmeas, desde que a proporção entre machos e fêmeas seja adequada.

A combinação dos dados deste trabalho com os dados da reprodução induzida “semi-natural” sugerem que o sêmen desta espécie possa ser diluído antes de ser utilizado em práticas de reprodução induzida em cativeiro (Reynalte-Tataje *et al.*, 2002). Cabe aqui uma breve comparação entre os dois sistemas de fertilização: a seco e semi-natural. O sistema semi-natural apresenta empiricamente melhores resultados frente ao sistema de fertilização a seco, principalmente no que se refere às taxas de fertilização de ovócitos. No entanto, para algumas finalidades, o sistema de fertilização a seco não pode ser substituído pelo sistema semi-natural. No sistema de fertilização semi-natural, diversos casais precisam ser colocados ao mesmo tempo nos tanques para que se obtenha sucesso. Desta forma, não se pode realizar cruzamentos dirigidos. Para programas de repovoamento e cruzamentos que visam programas de melhoramento genético, os cruzamentos dirigido (determinado macho com determinada fêmea) são cruciais e só podem ser obtidos com a técnica de fertilização a seco. Indicando que está técnica não pode ser abandonada ou substituída totalmente pela fertilização semi-natural.

Desta forma, é possível que a dose inseminante nesta espécie (volume de sêmen necessário para fecundar uma determinada quantidade de ovócitos) seja relativamente menor do que em outros peixes reofílicos, indicando que o sêmen possa ser diluído antes de ser utilizado, compensando o baixo volume que é liberado. Estudos relacionados para determinar a dose inseminante adequada para uso na fertilização artificial têm sido desenvolvidos em dourado, com a relação de 30.722 espermatozóides por ovócitos; em jundiá, com relação de 89.497 espermatozóides por ovócito; e piabanha, com relação de

314.481 espermatozóides por ovócito (Sanches *et al.*, 2009; Bombardelli *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2007). Em todos os casos mencionados, a relação entre os espermatozóides e o ovócito, permitiu obter a melhor taxa de fertilização no experimento.

Todos estes fatores combinados indicam a necessidade eminente de abordagens para calcular a dose inseminante desta espécie. Esta abordagem confirmará a evidência gerada neste estudo, de que o sêmen desta espécie pode ser diluído antes de ser usado, aumentando assim o volume obtido para cada macho e melhorando as taxas de fertilização, atingindo patamares adequados como os descritos empiricamente no sistema semi-natural.

Finalmente, o piaú é uma espécie oligospérmica quando comparado a outros peixes migradores nativos. Os machos respondem positivamente ao tratamento hormonal, que não pode ser responsabilizado pelo baixo volume de sêmen liberado. O baixo número de espermatozóides liberado e o pouco volume de sêmen são características da espécie. É bastante provável que o sêmen desta espécie possa ser diluído antes do uso, aumentando o volume de sêmen liberado por macho e possivelmente as taxas de fertilização de ovócitos. Esta possibilidade seria alvo muito interessante para futuras abordagens.

6. CONCLUSÕES

- O sistema reprodutor masculino de *L. macrocephalus* apresenta características similares à de outros peixes reofílicos, sem a presença de estruturas ou glândulas anexas que pudessem impedir a liberação do sêmen no momento da espermição;
- As características morfológicas do aparelho reprodutor masculino desta espécie, assim como, a estrutura do sistema de ductos testiculares não estão relacionadas com o baixo volume de sêmen liberado;
- O *L. macrocephalus* responde adequadamente ao tratamento hormonal com extrato de hipófise, evidenciado pelo aumento do índice gonadosomático (IGS) e pela dilatação dos túbulos seminíferos;
- O tratamento hormonal utilizado não apresenta relação direta com o baixo volume de sêmen liberado. Os dados aqui obtidos não sugerem necessidade de alteração de protocolo;
- A concentração espermática é similar à de outros peixes reofílicos, no entanto, o volume de sêmen liberado é muito inferior, resultando em um baixo número absoluto de espermatozoides liberados;
- Ultraestruturalmente, foi observado que os espermatozoides apresentam uma porção média robusta, um número maior de mitocôndrias, comparado com outras espécies e abas laterais nos flagelos.

7. REFERÊNCIAS

- Abimorad, G. E. 2004. Relações entre níveis de proteína e energia digestíveis em dietas com diferentes proporções de lipídeos e carboidratos para o crescimento do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Dissertação apresentada no programa de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, para o título de mestre em aquicultura.
- Akama, T. O., Nakagawa, H., Sugihara, K., Narisawa, S., Ohyama, C., Nishimura, S-I., O'Brien, D. A., Moremen, K. W., Millán, J. L., Fukuda, M. N. 2002. Germ cell survival through carbohydrate-mediated interaction with Sertoli cell. *Science*. 295: 124-127.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular biology of the cell*. Fifth edition. Garland Science, Taylor & Francis Group. USA.
- Alexandrino, A. C., Phan, M. T. Pinheiro, E. F. G. 1985. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas de Curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. *Bolm. Zool., Univ. S. Paulo*. 9: 159-175.
- Alves, M. D., Godinho, H. P. 1987. Gonadal differentiation of *Schizodon kneri* Steindachner, 1875 (Pisces, Anostomidae). *Rev. Brasil. Biol.* 47(1/2): 237-241.
- Amaral, A. A. 1999. Ciclo reprodutivo anual em machos de *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988) (Pisces, Characiformes, Anostomidae). Dissertação para obtenção do título de Mestre em Aquicultura em águas continentais. CAUNESP. Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- Amaral, A. A., Vicentini, C. A. 2001. Anatomia testicular de *Leporinus macrocephalus*. *Cadernos camilliani*. 2: 15-20.
- Andrade, R. F., Bazzoli, N., Rizzo, E., Sato, Y. 2001. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Brycon affinis* (Pisces: Characidae). *Tissue & Cell*. 33(5):524-532.

- Arguello, L., González, S., Atencio, V. 2001. Reproducción inducida de la liseta *Leporinus muyscorum* (Steindachner, 1902) con extracto pituitario de carpa (EPC). Revista MVZ Córdoba. 6(2): 97-101.
- Arias, J. A., Zaniboni-Filho, E., Cruz-Casallas, P. E. 2004. Ciclo testicular Del Yamú, *Brycon siebenthalaes* (Teleostei: characidae) en cautiverio. Actual Biol. 26(81): 185-195.
- Arias, J. A., Zaniboni-Filho, E., Aya, B. E. 2006. Indicadores Del ciclo reproductivo del yamú *Brycon amazonicus*, en cautiverio. Revista Orinoquia. 10:24-34.
- Batlouni, S. R., Carreño, F. R., Romagosa, E., Borella, M. I. 2005. Cell junction in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatum* (Pisces, Siluriformes). J. Mol. Hist. 36: 97-110.
- Batlouni, S. R., Romagosa, E., Borella, M. I. 2006. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. Anim. Reprod. Sci. 96: 116-132.
- Batlouni, S. R., Nóbrega, R. H., França, L. R., 2009. Cell junctions in fish seminiferous epithelium. Fish. Physiol. Biochem. 35 (1): 207-217.
- Bedore, A. G., Cardoso, E. L., Godinho, H. P. 1997. Biologia do sêmen do Curimatã-pacu (*Prochilodus marggravii*). Departamento de morfologia, ICB/UFMG.
- Billard, R. 1984. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. Cell Tissue Res. 237: 219-226.
- Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reprod. Nutr. Develop. 26 (4): 877-920.

- Bobe, J., Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. General and comparative endocrinology. 165: 535-548.
- Bombardelli, R. A., Morschbacher E. F., Capognolo, R., Sanches, E. A., Syperreck, M. A. 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinzas, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). Revista Brasileira de Zootecnia. 35(4):1251-1257.
- Brito, M. F. G., Bazzoli, N. 2003. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 55(5): 624-633. doi: 10.1590/S0102-09352003000500018
- Buckup, P. A., Menezes, N. A., Ghazzi, M. S. 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional, Rio de Janeiro.
- Burns, J. R., Quagio-Grassiotto, I., Jamieson, B. G. M. 2009. Ultrastructure of Spermatozoa: Ostariophysi, in: Jamieson, B. G. M. (Ed.), Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony fishes), New Hampshire: Science Publishers, Endfield, pp. 287-388.
- Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. 2009. Methods in reproductive aquaculture, Marine and Freshwater species. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. pp 3-63.
- Carolsfeld, J., Godinho, H. P., Zaniboni Filho, E. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. J. Fish. Biol. 63: 472-489.
- Carvalho, A. M. R. 2001. Cripreservação do sêmen de piapara (*Leporinus elongatus*). Ms thesis, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

- Castagnolli, N. 1992. Espécies nativas próprias para a piscicultura. Em: Criação de peixes de água doce. Jaboticabal. FUNEP. pp 60-69.
- CBRA - Colégio brasileiro de reprodução animal. Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
- Cognato, D. P., Bernhardt, F. C. 2006. Reproductive biology of a population of *Gymnotus aff. carapo* (Teleostei: Gymnotidae) from southern Brazil. *Neotropica Ichthyology*. 4(3): 339-348.
- Cruz, V. L. B. 2001. Criopreservação de sêmen de curimatá *Prochilodus lineatus* = *scrofa* (Characiformes, Prochilodontidae). Ms Thesis, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.
- Cruz-Casallas, P. E., Pardo-Carrasco, S. P., Lombo-Castellanos, P. E., Lombo-Rodriguez, D. A., Pardo-Mariño, J. E. 2004. Cryopreservation of Yamú *Brycon Siebenthalae* Milt. *World Aquaculture Society*. 35(4):529-535.
- Dahle R., Taranger, G. L., Karlsen, O., Kjesbu, O., Norberg, B. 2003. Gonadal development and associated changes in liver size and sexual steroids during the reproductive cycle of captive male and female Atlantic cod (*Godus morhua*). *Comparative biochemistry and physiology*. 136: 641-653.
- De Souza, B. E., Sanchez, E. A., Baggio, D. M., Romagosa, E., Bombardelli, R. A., Piana, P. A., Vidal, E. 2007. Interação entre a relação de espermatozóide ovócito⁻¹ e o volume de água empregados na fertilização artificial de ovócitos de Curimatá (*Prochilodus lineatus*). *Memórias do primeiro congresso brasileiro de produção de peixes nativos de água doce*.

- Donaldson, E. M. 2000. Hormones in finfish aquaculture, em: Encyclopedia of Aquaculture, ed. por Stickney R. R. Texas A&M University. USA.
- Duarte, M., Marbá, N., Holmer, M. 2007. Rapid domestication of marine species. Science. 316 (5823): 382-383.
- Durán, A. C., Sans-Coma, V., Arque, J. M., Cardo, M., Fernández, B., Franco, D. 1992. Blood supply to the interventricular septum of the heart in rodents with intramyocardial coronary arteries. Acta Zool-Stockholm. 73 (4), 223-339
- FAO, Departamento de Pesca e Acuicultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. 2007. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. Roma, Italia. pp 129-144.
- Feng, L-X., Chen, Y., Dettin, L., Reijo, R. A., Herr, J. C., Goldberg, E., Dym, M. 2002. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. Science. 297: 392-395.
- Ferreira, R. M. A., Godinho, H. P. 1990. Reproductive biology of the white-piau, *Schizodon knerii* (Steindachner, 1875) (Anostomidae) from a reservoir in southeast Brazil. Eur. Arch. Biol. 101: 331-344.
- Fraile, B.; Sáez, F. J.; Vicentini, C. A.; De Miguel, M. P. & Paniagua, R. 1992. The testicular cycle of *Gambusia affinis holbrooki* (Teleostei: Poeciliidae). J. Zool., Lond., 228: 115-126.
- Franciscato, R. T., Murgas, L. S. D., Milionarini, A. B., Silva, M. O. B., Logato, P. V. R. 2002. Qualidade do sêmen de Curimatã (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte. 26(3): 213-215.

- Frasca Scorvo, C. M. D. 1999. Comportamento alimentar do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em tanques de cultivo. Dissertação apresentada no programa de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, para o título de mestre em aquicultura.
- Fresneda, A., Lenis, G., Agudelo, E., Ángel, O., M. 2004. Espermiación inducida y criopreservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev. Col. Cienc. Pec. 17: 46-52.
- Garavello, J. C., Britski, H. A. 1988. *Leporinus macrocephalus* sp. N. da bacia do rio Paraguai (Ostariophysi, Anostomidae). Naturalia, São Paulo. 13: 67-74.
- Garber, A. F., Fordham, S. E., Symonds, J. E., Trippel, E. A., Berlinzky, D. L. 2009. Hormonal induction of ovulation and spermiation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquaculture. 295: 179-183.
- Garutti, V. 2003. Piscicultura ecológica. Fundação Editora da Unesp. São Paulo, Brasil. pp 11-15.
- Gholami, H., Chamani, M., Towhidi, A., Fazeli, M. H. 2010. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and froze-thawed semen in Holstein bulls. Theriogenology. Article in press. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.06.025
- Godinho, H. P. 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. Rev. Bras. Reprod. Anim. 31: 351-360.
- Godinho, H. P., Coser, A. M. L. 1995. Bases morfofuncionais da espermatogênese e criopreservação de sêmen de peixes. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, 1995. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.16-25.

- Gomiero, L. M., Braga, F. M. D. 2007. Gonadosomatic relation and reproductive strategy of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) in the Serra do Mar state Park-Núcleo Santa Virginia, Atlantic Forest, Brazil. *Braz. J. Biol.* 67(4): 727-733.
- Gonçalves, T. L., Bazzoli, N., Brito, M. F. G. 2006. Gametogenesis and reproduction of the matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864)(Pisces: Characidae) in the São Francisco river, Minas Gerais, Brazil. *Braz. J. Biol.* 66(2A): 513-522.
- González, P., Oyarzún C., 2002. Variabilidad de índices biológicas en *Pinguipes chilensis* Valenciennes, 1833 (Perciformes, Pinguipedidae): Estan realmente correlacionadas?. *Gayana (Concepc.)*. 66(2): 249-253. doi: 10.4067/S0717-65382002000200023
- Grier, H. J. 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.* 24: 345-357.
- Grier, H. J., Linton, J. R., Leatherland, J. F., De Vlaming, V. L. 1980a. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Amer. J. Anat.* 159, 331-345.
- Grier, H. J., Horner, J. e Mahesh, V. B. 1980b. The morphology of enclosed testicular tubules in a teleost fish, *Poecilia latipinna*. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 99 (3) :268-276.
- Grier, H. J. 1993. *Comparative organization of sertoli cells including the sertoli cells barrier*. In: Russell, L. D. & Griswald, M. D. (eds.), *The sertoli cell*, Cache River Press, Clearwater, FL, pp. 704-739.
- Grier, H. J., Taylor, R. G. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. *J. Fish. Biol.* 53: 521-542.
- Grier, H. J., Uribe-Aranzábal, M. C. 2009. The testis and spermatogenesis in teleosts, in: Jamieson, B. G. M. (Ed.), *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony fishes)*, New Hampshire: Science Publishers, Endfield, pp. 119-142.

- Gulland, J.A. 1983. Fish stock assessment. FAO/ Jhon Wilwy and Sons. Chichester, England. 223.
- Hilbig, C. C.; Bombardelli, R. A.; Sanches, E. A.; Oliveira, J. D.; Baggio, D. M.; Souza, B. do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). Acta Scientiarum, Animal Sciences, v.30, n.2. p. 217-224, 2008.
- Hogarth, C. A., Griswold, M. D. 2010. The key role of vitamin A in spermatogenesis. The journal of clinical investigation. 120 (4): 956-962.
- Holland, M. C. H., Hassin, S., Zohar, Y. 2002. The effect of long-term testosterone, gonadotropina-releasing hormone agonist and pimozide treatments on testicular development and luteinizing hormone levels in juvenile and early maturing striped bass, *Morone saxatilis*. General and Comparative Endocrinology. 129: 178-187.
- Huhtaniemi, I. 1999. Endocrine regulation of male reproduction, in: Male reproductive function. Ed por Wang, C. Harbor-UCLA medical center, Torrance, California, USA. pp 1-19.
- Jamieson, B. G. M. 1991. Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press. 319p.
- Kavamoto, E. T., Ferraz, E. M., Talmelli, E. F. A., Mainardes-Pinto, C. S. R., Romagosa, E., Narahara, M. Y., Barnabe, V. H., Campos, B. E. S. 1996. Estimulação da espermição em curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner) através de aplicação de HCG (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). Revta Brás. Zool. 13 (1): 27-38.
- Kavamoto, E. T., Barnabe, V. H., Campos, B. E. S., Andrade-Talmelli, E. F. 1998. normalidades morfológicas nos espermatozóides do Curimatá, *Prochilodus scrofa*

- (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo. 25: 61-66.
- Kerr, J. B., Loveland, K. L., O'Bryan, M. K., Kretser, D. M. 2006. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In Physiology of reproduction. Third edition. Elsevier.
- Komatsu, T., Bhandari, R. K., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Nakamura, M. 2006. GnRHa-accelerated spermatogenesis in the testes of underyearling golden rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). Aquaculture. 257:558-565.
- Koulish, S., Kramer, C. R., Grier, H. J. 2002. Organization of the male gonad in a Protogynous Fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). Journal of Morphology. 254: 292-311.
- Lacerda, S. M. S. N., Batlouni, S. R., Silva, S. B. G., Homem, C. S. P., França, L. R. 2006. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. Anim. Reprod. 3 (2): 146-159.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R. A., Weismann, T., 1993a. The spermatic duct of salmonid fishes (Salmonidae, Teleostei). Morphology, histochemistry and composition of the secretion. J Fish Biol. 42, 79-93.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R. A., Weismann, T. 1993b. The efferent duct system of the male gonads of the European pike (*Esox Lucius*): Testicular efferent ducts, testicular main ducts and spermatic ducts. J. Submicr Cytol Pathol. 25, 487-498.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R. A., Weismann, T. 1994. The testicular main ducts and spermatic ducts in cyprinid fishes. Morphology, fine structure and histochemistry. J Fish Biol. 44, 937-951.

- Lahnsteiner, F., Patzner, R. A. 1998. Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. *Aquaculture*. 52: 726-742.
- Lahnsteiner, F. 2000. Introduction to the special issue on cryopreservation of gametes in aquatic species. *Aquaculture. Research*. 31: 229.
- Lahnsteiner, F. 2003. Morphology, fine structure, biochemistry, and function of the spermatic ducts in marine fish. *Tissue Cell*. 35, 363-373.
- Lahnsteiner F., Patzner R. A., 2009. Male reproductive system: spermatic duct and accessory organs of the testis, in: Jamieson, B.G.M., (Ed.), *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony fishes)*, New Hampshire: Science Publishers, Endfield, pp. 143-186.
- Le Gac, F., Loir, M. 1999. Male reproductive system, fish. In: *Encyclopedia of reproduction*. San Diego: Academic Press. 3: 20-30.
- Leal, M. C., Cardoso, E. R., Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., Bogerd, J., França L. R., Schulz, R, W. 2009. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of reproduction*. 81: 177-187.
- Lee, Y. H., Kim, K. H. 1999. Ultrastructure pf the south torrent catfish, *Liobagrus mediadiposalis* (Teleostei, Siluriformes, Amblicipitidae) spermatozoon. *Korena J. Limnol*. 32 (3): 271-280.
- Lee, Y. H., Kim, K. H. 2001. The ultrastructure of spermatozoa of the slender catfish, *Silurus microdorsalis* (Teleostei, Siluriformes, Siluridae). *J. submicrosc. Cytol. Pathol*. 33(3): 329-336.

- Loir, M., Cauty, C., Planquette, P., Le Bail, P. Y. 1989. Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfish. *Aquatic Living Resources*. 2: 45-56.
- Maria, A. N., Murgas, L. D. S., Silva, M. O. B., Milionari, A. B., Franciscatto, R. T., Logato, P. V. R. 2004. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*- Holmberg, 1887). *Cien Agrotec*. 28: 191-194.
- Mattei, X., Siau, Y., Thiaw, O. T., Thiam, D. 1993. Peculiarities in the organization of the testis of *Ophidion* sp. (Pisces, Telesotei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. *J. Fish. Biol.* 43: 931-937.
- Mazzoldi, C., Lorenzi, V., Rasotto, M. B. 2007. Variation of male reproductive apparatus in relation to fertilization modalities in the catfish families Auchenipeteridae and Callichthyidae (Teleostei: Siluriformes). *Journal of Fish Biology*. 70: 243-256.
- Miliorini, A. B., Murgas, L. D. S., Viveiros, A. T. M., Franciscatto, R. T., Silva, M. B., Maria, A. N. 2002. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, usando diferentes concentrações de dimetilsulfoxido. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte. 26(3): 209-211.
- Miura, T., Miura, C. I. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish. Physiol. Biochem*. 28: 181-186.
- Mitsuiki, D. 2002. Aspectos morfofuncionais das células de Sertoli de peixes teleósteos. Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura. UNESP.

- Montoya-López, A. F., Tabares, C. J., Echeverri, A., Arboleda L., Olivera-Angel, M. 2006. Descripción anatómica e histológica de las gónadas en Sabaleta (*Brycon henni*, Eigmann 1913). Rev. Col. Cienc. Pec. 19(2): 187-196.
- Moraes, G. F. 2004. Resfriamento e congelamento do sêmen de Piau-açu *Leporinus macrocephalus*. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia, área de concentração em aquicultura.
- Murgas, L. D. S., Silva, M. O. B., Mello, C. B. M., kabeya, D. M., Santan, G. M. 1999. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). Rev. Bras. Reprod. Anim. 23: 246-248.
- Murgas L. D. S. Milionari, A. B., Franciscatto, R. T., Maria, A. N. 2004. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) a 4°C. Rev. Bras. Zootec. 33:1361-1365. doi:10.1590/S1516-35982004000600001.
- Mylonas, C. C., Fostier, A., Zanuy, S. 2010. Broodstock managemnet and hormonal manipulations of fish reproduction. General and comparative endocrinology. 165: 516-534.
- Mylonas, C. C., Scott, A. P., Vermeirssen, E. L. M, Zohar, Y. 1997. Changes in plasma gonadotropina II and sex steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release gonadotropina-releasing hormone agonist-delivery system. Biology of reproduction. 57: 669-675.
- Nakamura, I., Kusakabe, M., Young, G., 2003. Regulation of steroidogenic enzyme mRNAs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian follicles in vitro. Fish Physiol. Biochem. 28, 355–356.
- Nóbrega, R. H. 2003. Capacidade suporte das células de Sertoli e alterações do epitélio germinativo masculino e do tecido intersticial durante o ciclo reprodutivo de peixes

- neotropicais. Monografia para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – UNESP- Botucatu, São Paulo, Brasil.
- Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., França, L. R. 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35: 197-206.
- Okusawa, K. 2002. Puberty in teleosts. *Fish Physiology and biochemistry*. 26: 31-41.
- Olaya-Neto, C., Tordecilla-Petro, G., Seguro-Guevara, F. 2008. Relación longitud-peso del rubio (*Salminus affinis* Steindachner, 1880) en la cuenca del rio Sinú, Colombia. *Rev. MVZ, Córdoba*. 13(2): 1349-1359.
- Olivera-Junior, R. L. 2003. Análise comparativa da reprodução do Mandi-amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces, Pimelodidae), em dois trechos do rio São Francisco, MG. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.
- Parenti, L. R., Grier, H. J. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol*, 44, 333-348.
- Pillay, T. V. R. e Kutty, M. N. 2005. *Aquaculture: Principles and Practices*. 2nd Edition. Blackwell Publishing, Oxford. 624pp.
- Prieto, C. A. 2004. Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hillari* (Pisces, Teleostei). Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, como parte das exigências do título de Mestre em Aquicultura.

- Prieto, C. A. 2007. Morfologia testicular e estrutura da espermatogênese em peixes ornamentais, Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*; Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* e Matio Grosso, *Hyphessobrycon eques* (Teleostei, Characiformes). Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, como parte das exigências do título de Doutor em Aquicultura.
- Pudney, J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. Microscopy research and technique. 32: 459-497.
- Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J. 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Museu de Ciências e Tecnologia. pp 1-3.
- Reynalte-Tataje, D., Esquivel, B. M., Esquivel, J. R., Zaniboni-Filho, E. 2002. Reproducción inducida del Piauçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello y Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo. 28 (1): 11-18.
- Reynalte-Tataje, D., Zaniboni-Filho, E., Muelbert, B. 2001. Stages of the embryonic development of the piavuçu *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988). Acta Scientiarum. 23 (4): 823-827.
- Ribeiro, R. I. M. A., Godinho, H. P. 2003. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 55(1). 00-00. doi: 10.1590/S0102-09352003000100011.
- Rolland, A. D., Jégou, B., Pineau, C. 2008. Testicular development and spermatogenesis: harvesting the postgenomics bounty, in: Molecular mechanisms in spermatogenesis, ed. por Cheng, Y. C. pp 16-41.

- Romagosa, E., Yamane Narahar, M., Da Silva Ayroza, L. M., Borella, M. I., Fenerich-Verani, N. 2000. Reproductive cycle of male matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869)(Teleostei: Characiformes). Braz. J. Morphol. Sci. 17:101-105.
- Rudolf, S. S. 2009. Effects of hypoxia on fish reproduction and development, em: Hypoxia da serie Fish physiology. (ed.) Richards, J., Farrell, A., Brauner, C. Elsevier. 27: 79-141.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., Nash, J. P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. 234: 1-28.
- Sanches, E. A., Bombardelli, R. A., Baggio, D. M., Souza, B. E. 2009. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. Revista Brasileira de Zootecnia. 38(11):2091-2098.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Verani, J. R., Vieira, L. J. S., Godinho, H. P. 2000. Induced reproductive response of the neotropical anostomid fish *Leporinus elongates* Val. Under captive breeding. Aquaculture Research. 31: 189-193.
- Schally, A. V. 1978. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. Science. 202: 18-28.
- Schulz, R. W., Miura, T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiology and biochemistry. 26: 43-56.
- Schulz, R. W., Menting, S., Bogerd, J., França, Luiz. R., Vilela, D. A. R., Godinho, H. P. 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis-Evidence from two fish species belonging to different orders. Biology of reproduction. 73: 891-898.
- Schulz, R. W., França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nóbrega, R. H., Miura, T. 2009. Spermatogenesis in fish. General and comparative endocrinology. 165: 390-411.

- Selman, K., Wallace, R. A. 1986. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. Am. Zool. 26: 173-192.
- Shimoda, E., Andrade, D. R., Vidal Junior, M. V., Godinho, H. P., Yasu, G. S. 2007. Determinação da razão ótima de espermatozóides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces-characidae). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59(4): 877-882.
- Sidlauskas, B. L., Vari, P. V. 2008. Phylogenetic relationships within the South American fish family Anostomidae (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Zoological Journal of the Linnean Society. 154: 70–210.
- Streit, D. P., Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Caçador, W., Sakaguti, E. S., Povh, J. A., Souza, E. D. 2003. Estudo comparativo da indução hormonal da espermição em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. Acta Scientiarum, Animal Sciences. Maringá. 25 (2): 261-266.
- Streit, D. P., Ribeiro, R. P., Moraes, G. V., Mendez, L. V., Gallo, J. M., Digmayer, M., Povh, J. A. 2006. Características qualitativas do sêmen de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. Biosci. J. 22(3): 119-125.
- Swanson, E. W., Bearden, H. J. 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. Journal of Animal Science. 10:981-987.
- Swanson, P., Dickey, J. T., Campbell, B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. Fish Physiology and biochemistry. 28: 53-59.
- Tabares, C. J., Tarazona, A. M., Ángel, M. O. 2005. Fisiologia de la activación del espermatozoides en peces de agua dulce. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 18(2): 149-161.

- Tahara, D., Hatano, T., Iwatani, H., Koya, Y., Hayakawa, Y. 2010. Annual changes in testicular development and occurrence of parasperm in the male reproductive organs of fourspine sculpi, *Cottus kazika*. Ichthyol. Res. 57: 62-70.
- Takahashi, E. L. H. 2006. Ciclo reproductivo da Tabaran, *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849)(Characidae, Salmininae) na região do baixo Rio Sorocaba, SP. Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da UNESP como parte das exigências para obtenção do título de Mestres em Aquicultura.
- Thomé, R. G., Bazzoli, N., Rizzo, E., Santos, G. B., Ratton, T. F. 2005. Reproductive biology of *Leporinus taeniatus* Lütken (Pisces, Anostomidae) in juramento Reservoir, São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 22(3): 565-570.
- Valdebenito, I. 2008. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. Arch. Med. Vet. 40: 115-123.
- Valenti, W. C. 2002. Aquicultura sustentável. In: Congresso de Zootecnia, 12o, Vila Real, Portugal, 2002, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais. pp111-118.
- Vazzoler, A. E. A. M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos. Teoria e prática. EDUEM, Maringá.
- Veríssimo-Silveira, R. 2003. Ciclo reprodutiva e cinética da espermatogênese do Dourado (*Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849). Dissertação para obtenção do título de Mestre em Aquicultura em água continentais. CAUNESP. Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- Veríssimo-Silveira, R. 2007. Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de peixes da subordem Characoidei (Teleostei, Characiformes): uma abordagem

- filogenética. Dissertação para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Zoologia. Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu São Paulo, Brasil.
- Vicentini, C. A., Franceschini-Vicentini, I. B., Benetti, E. J., Orsi, A. M. 2001. Testicular ultrastructure and morphology of the seminal pathway in *Prochilodus scrofa*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 33 (3): 357-362.
- Vicentini, C.A., Muñoz, M. E., Vicentini, I. B. F. 2010. Ultrastructural aspects of spermatogenesis in *Phalloceros caudimaculatus* (Teleostei, Poeciliidae). Int. J. Morphol., 28(3):951-956.
- Vieira, E. F., Isaac, V. J., Fabré, N. N. 1999. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalminidae), no baixo Anazonas, Brasil. Acta Amazonica 29 (4):625-638.
- Vilela, D. A. R., Silva, S. G. B., Peixoto, M. T. D., Godinho, H. P., França, L. R. 2003 Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. Fish Physiol Biochem. 28: 187-190.
- Viveiros, A. T. M., Godinho, H. P. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish. Physiol. Biochem. 35: 137-150.
- Walter, I., Tschulenck, W., Schabuss, M., Miller, I., Grillitsch, B. 2005. Structure of the seminal pathway in the European Chub, *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae); Teleostei. J Morphol. 263, 375-391.
- Woyanovich, E., Horvath, L. A. 1983. A propagação artificial de peixes tropicais. Manual de extensão. Brasília: FAO/ CODEVASF/CNPq. pp 220.
- Zaiden, S. F. 2000. Morfologia gonadal e metabolismo energético da Piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativeiro, durante o

ciclo reprodutivo anual. Tese apresentada ao Centro de Aquicultura da UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Zaniboni Filho, E., Weingartner, M. 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte. 31(3): 367-373.

Zohar, Y., Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*. 197: 99-136.