

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
Jumma Miranda Araújo Chagas

OS EFEITOS DA ALTA TEMPERATURA E DO MYLERAN
(BUSULFAN) NA ESPERMATOGÊNESE DE *Devario*
aequipinnatus (TELEOSTEI, CYPRINIDAE)

Ilha Solteira

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
Jumma Miranda Araújo Chagas

**OS EFEITOS DA ALTA TEMPERATURA E DO MYLERAN
(BUSULFAN) NA ESPERMATOGÊNESE DE *Devario
aequipinnatus* (TELEOSTEI, CYPRINIDAE)**

Prof. Dra. Rosicleire Veríssimo Silveira
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Campus de Ilha Solteira, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal. Especialidade: Sistema de Produção.

Ilha Solteira

2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

C433e Chagas, Jumma Miranda Araújo .
Os efeitos da alta temperatura e do Myleran (Busulfan) na espermatogênese de *Devario aequipinnatus* (Teleostei, Cyprinidae) / Jumma Miranda Araújo Chagas. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2015
69 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Produção Animal, 2015

Orientador: Rosicleire Veríssimo Silveira
Inclui bibliografia

1. Células germinativas. 2. Depleção. 3. Espermatogênese. 4. Testículo. 5. Peixe.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Os efeitos da alta temperatura e do Myleran (busulfan) na espermatogênese de *Devario aequipinnatus* (Teleostei, Cyprinidae)

AUTORA: JUMMA MIRANDA ARAÚJO CHAGAS

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Profa. Dra. CRISTIELE DA SILVA RIBEIRO

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Prof. Dr. GEORGE SHIGUEKI YASUI

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga

Data da realização: 20 de fevereiro de 2014.

Dedicatória

Dedico meu mestrado a **meus pais**, sem os quais não estaria aqui, por terem fornecido condições para me tornar a profissional e mulher que sou e serão responsáveis por cada sucesso obtido e cada degrau avançado pelo resto de minha vida. Que entre risos e choros de saudade e diante das inúmeras dificuldades, fizeram o possível e quase o impossível para que eu pudesse continuar meus estudos.

Durante todos esses anos vocês foram para mim um grande exemplo de força, de coragem, perseverança e energia infinita para nunca desistir diante do primeiro obstáculo encontrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as oportunidades que me foram dadas durante minha vida, por ter conhecido pessoas e lugares interessantes e também por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas para o meu aprendizado.

A minha mãe **Eliana Miranda Araújo** e meu pai **Pedro César Chagas**, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todas as horas de minha vida, de todas as maneiras, sem eles não teria conseguido me manter firme diante dos obstáculos.

A meus irmãos **Dandhara, Hannah e Pedro**, que sempre me deram força e coragem me apoiando em todos os momentos de minha vida.

A **Douglas Ribeiro**, meu namorado, amigo e colaborador, pelos ensinamentos, dicas profissionais, apoio, paciência e enorme contribuição neste trabalho.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Rosicleire Veríssimo Silveira** e ao **Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira** pela oportunidade, orientação, conhecimento compartilhado e contribuição ao trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, **Prof. Dr. Igor Paiva Ramos** e **Profa. Dra. Cristiele da Silva Ribeiro**, pelas preciosas sugestões e colaboração para este trabalho final.

Aos membros da banca desta defesa, **Profa. Dra. Cristiele da Silva Ribeiro**, **Prof. Dr. George Shiguete Yasui**, **Profa. Dra. Elizabeth Romagosa**, e **Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira** que gentilmente aceitaram o convite para fazer parte desta etapa final do mestrado.

Aos **amigos e colegas do Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.Neo)**, por transformarem horas de trabalho em momentos agradáveis e também pelo incentivo e contribuição ao trabalho.

Ao curso de **Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Animal**, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

A **Raphael da Silva Costa** pela contribuição na parte estatística desse trabalho.

Todos nós já passamos por um momento de hesitação, por dúvidas enormes e mirins, que talvez nem merecessem ser chamadas de dúvidas, de tão pequenas. Nesta hora, precisamos de um empurrãozinho. E é aos

“empurradores” **Laíza, Cristiane e Raphael**, eu agradeço, obrigada por perceber em mim um talento que minha autocrítica jamais permitiria que se desenvolvesse. Em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo.

A **todos** que passaram pela minha vida e que de alguma forma contribuíram para este trabalho e para minha formação. Muito Obrigada!!!

“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores... Tornam-se seu destino”.

Mahatma Ganghi

RESUMO

Em teleósteos, a utilização de transplante de espermatogônias tronco está criando um cenário novo e promissor na área de biotecnologia e produção em aquicultura, possibilitando a preservação de espécies em perigo de extinção. Esta técnica consiste na remoção de células tronco espermatogoniais do testículo de um animal doador e a sua transferência para o testículo de um receptor. Para garantir a eficiência desta técnica o receptor deve ter sua espermatogênese endógena suprimida, pois a eficiência do transplante depende do sucesso na competição entre células germinativas transplantadas e células germinativas endógenas nos túbulos seminíferos. Este estudo teve por objetivo promover experimentalmente a depleção da espermatogênese endógena de *Devario aequipinnatus*, por meio da droga quimioterápica Myleran (Busulfan) e sua associação com a temperatura de 30°C. Foram definidas quatro fases de maturação gonadal para o ciclo testicular de *D. aequipinnatus*: Maturação Inicial, Maturação Intermediária, Maturação Final e Regressão, essas definições tiveram como base as alterações do epitélio germinativo testicular associado aos estágios das células germinativas presentes. Para depleção foram testadas duas dosagens, no T15/18 foram aplicadas duas injeções, via intracelomática, com intervalo de 10 dias entre as mesmas, sendo a primeira dose de 15 mg kg⁻¹ Myleran (Busulfan) e a segunda com 18 mg kg⁻¹ de Myleran. No T40 foi aplicado somente uma injeção contendo 40 mg kg⁻¹ de Myleran (Busulfan). Como grupo controle foi utilizado uma unidade experimental sem a inclusão de qualquer tipo de droga, em que os animais permaneceram sob as mesmas condições de temperatura, alimentação e fotoperíodo oferecidas para os animais utilizados dos tratamentos. O T15/18 e o T40 apresentaram uma redução significativa na quantidade de Espermatócitos e consequentemente um aumento na quantidade de lúmen tubular nos testículos dos animais analisados. Três dias após a aplicação do Busulfan, tanto para dosagem única como para dosagem dupla de Busulfan houve um aumento de picnose nas espermatogônias A-ind. Foram encontrados indivíduos em maturação final em todos os tratamentos inclusive no controle provavelmente devido a temperatura elevada, no entanto a inibição da espermatogênese foi mais prolongada e eficiente nos tratamentos com Busulfan, onde em alguns espécimes não foram observados nenhum cisto de células germinativas no epitélio germinativo. E no T40 mesmo na coleta 5 com 17 dias após a aplicação do Busulfan a espermatogênese ainda não havia retornado, diferentemente do observado com controle e no T15/18.

Palavras-chave: Células germinativas. Depleção. Peixe. Testículo.

ABSTRACT

In teleosts, the use of spermatogonial stem transplant is creating a new and promising scenario in the area of biotechnology and aquaculture production, enabling the preservation of species in danger of extinction. This technique involves the removal of spermatogonial stem cells of the testis of a donor animal and its transfer to the testicle of a receiver. To ensure the efficiency of this technique the receiver shall have its endogenous spermatogenesis deleted because the transplant efficiency depends on the success in the competition between transplanted germ cells and endogenous germ cells in the seminiferous tubules. This study aimed to experimentally promote depletion of endogenous spermatogenesis *Devario aequipinnatus* through the chemotherapy drug Myleran (Busulfan) and its association with the temperature 30 ° C. Maturation of four phases have been defined for testicular cycle *D. aequipinnatus*: Maturation Home, Intermediate maturation, maturation and Final Regression, these definitions were based on the changes of the testicular germinal epithelium associated with the stages of germ cells present. For depletion two doses were tested in the T15 / 18 were applied two injections via intracelomic with an interval of 10 days between them, the first dose of 15 mg kg⁻¹ Myleran (Busulfan) and second with 18 mg kg⁻¹ Myleran. T40 was applied only in an injection containing 40 mg kg⁻¹ Myleran (Busulfan). The control group was used an experimental unit without the inclusion of any type of drug, where the animals were kept under the same conditions of temperature, photoperiod and food offered to the animals used treatments. The T15 / 18 and T40 showed a significant reduction in the number of spermatocytes and consequently an increase in the amount tubular lumen in the testes of the animals examined. Three days after application of Busulfan for both single dose and double dose of Busulfan for an increase in pyknosis in spermatogonia A-ind. Final maturation in individuals were found in all treatments including the control probably due to high temperature, however, the inhibition of spermatogenesis was more prolonged and effective in treatments with Busulfan, where in some specimens were observed no cyst germ cells in germinal epithelium . And in the T40 even in collecting 5 to 17 days after application of Busulfan spermatogenesis had not yet returned, different from that observed with control and T15 / 18.

Keywords: Germ cells. Depletion. Fish. Testis.

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
1.1 INTRODUÇÃO.....	12
REFERÊNCIAS.....	19
1.2 OBJETIVOS.....	24
2 CAPÍTULO 2 - CICLO TESTICULAR DE <i>Devario aequipinnatus</i>	
(Teleostei, Cyprinidae).....	25
2.1 INTRODUÇÃO.....	28
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.3 RESULTADOS.....	30
2.4 FIGURAS.....	34
2.5 DISCUSSÃO.....	43
2.6 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
3 CAPÍTULO 3 – SUPRESSÃO DA ESPERMATOGÊNESE EM <i>Devario</i>	
<i>aequipinnatus</i> (Teleostei, Cyprinidae).....	50
3.1 INTRODUÇÃO.....	52
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.3 RESULTADOS.....	56
3.4 FIGURAS.....	60
3.5 DISCUSSÃO.....	65

3.6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

Em teleósteos, a utilização de transplante xenogênico (interespecífico) ou singênico (intra-específico) de espermatogônias tronco está criando um cenário novo e promissor na área de biotecnologia e produção aquícola, possibilitando a preservação de espécies em perigo de extinção e estudos envolvendo a biologia da reprodução (SCHULZ et al., 2010).

O transplante de espermatogônias consiste na remoção de células tronco espermatogoniais do testículo de um animal doador e transferência dessas células para o testículo de um receptor, onde possivelmente estas células irão se desenvolver formando espermatozoides a partir do genoma doador. Esta técnica foi usada inicialmente por Brinster e Avarbock (1994) e Brinster e Zimmermann (1994) em camundongos e vem proporcionando grandes avanços no estudo do processo espermatogênico.

O receptor considerado ideal para o transplante de espermatogônias deve conter nos túbulos seminíferos, somente células de Sertoli normais (BRINSTER et al., 2003). Para que isto ocorra é necessário que os receptores tenham sua espermatogênese endógena suprimida pois a eficiência do transplante depende do sucesso na competição entre células germinativas transplantadas e células germinativas endógenas nos túbulos seminíferos (SHINOHARA et al., 2002). Um dos métodos utilizados para esta finalidade é a depleção da espermatogênese, utilizando tratamentos com drogas quimioterápicas (BRINSTER; AVARBOCK, 1994; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994; SHINOHARA et al., 2002; BRINSTER et al., 2003; LACERDA, 2013; PACCHIARINI, 2014; MAJHI et al., 2014) ou radiação local (KIM et al., 2005). Contudo, o uso de radiação em peixes é inviável, pois as gônadas estão localizadas na cavidade celomática, sendo praticamente impossível irradiá-las sem uma abordagem cirúrgica (MAJHI et al., 2009).

Um dos medicamentos mais utilizados com a finalidade de que ocorra a depleção das células germinativas é o Busulfan (ou Bulsufano) (1,4-dimetanosulfonoxibutano), um agente quimioterápico, alquilante e citostático, facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal e que apresenta uma meia vida de 2 a 3 horas (MOLENAAR et al., 1985). Os efeitos citotóxicos do Busulfan se devem, principalmente, a promoção de ligações cruzadas no DNA através da transferência

de radicais alquil aos nucleotídeos, levando à morte celular em tecidos com alto índice de proliferação, a exemplo do epitélio dos túbulos seminíferos (LACERDA, 2006). Deste modo, ele vem sendo muito utilizado, pois elimina as células da linhagem germinativa, sem prejudicar as células de Sertoli, que são necessárias à formação dos cistos espermatogênicos. Este procedimento torna os animais aptos a receber o transplante das células-tronco espermatogoniais dos doadores (BRINSTER et al., 2003).

No entanto, estudos apenas com Busulfan não se mostraram tão eficientes para eliminar células germinativas em peixes como se mostraram em mamíferos (BILLARD, 1982). Portanto, testou-se a eficácia do tratamento com Busulfan em combinação com alta temperatura da água, um fator ambiental que, por si só, pode provocar degeneração das células germinativas em peixes (STRUSSMANN; SAITO; TAKASHIMA, 1998; VILELA et al., 2003; BYERLY et al., 2005; LACERDA, 2006; 2010; NÓBREGA et al., 2010; MAJHI et al., 2014).

Poucos são os estudos referentes à depleção da espermatogênese em peixes, a exemplo de *Danio rerio* (NÓBREGA et al., 2010), *Odontesthes hatcheri* (MAJHI et al., 2009; 2014), *Oreochromis niloticus* (LACERDA, 2006; 2010), *Oncorhynchus mykiss* (BILLARD, 1982), *Solea senegalensis* (PACCHIARINI et al., 2014), sendo insuficiente para a padronização desta metodologia. Pouco se conhece a respeito do tempo em que os animais permanecem com os testículos deplecionados após essas exposições (Busulfan ou a temperatura), bem como o tempo necessário de exposição a esses fatores, para obtenção da depleção por um longo período. Informações estas que são de extrema importância para garantir o sucesso no transplante e fixação das espermatogônias no receptor.

Em trabalhos anteriores foram testadas algumas dosagens de Busulfan dentre elas 18 mg/kg; 15 mg/kg; 20 mg/kg; 30 mg/kg; 40 mg/kg (LACERDA 2006; 2010; MAJHI et al. 2009, 2014; NÓBREGA et al. 2010), em todos estes trabalhos estas dosagens foram associadas a diferentes temperaturas e as que garantiram maior eficiência do transplante de espermatogônias foram a dosagem mais alta em conjunto com a temperatura elevada. Pacchiarini et al. (2014), avaliou os efeitos do Busulfan na taxa de crescimento e na depleção das células germinativas, as dosagens utilizadas foram de 5, 10, 20, 40 e 80 mg kg⁻¹. E foi o único trabalho encontrado na literatura que avaliou os efeitos da depleção com o Busulfan. Os

demais trabalhos avaliaram esta eficiência apenas na finalização de todo o transplante e não como uma etapa abordada separadamente.

De acordo com o citado acima, pode-se perceber a necessidade de mais estudos referentes à depleção da espermatogênese em peixes, pois os dados encontrados na literatura se mostram insuficiente para a padronização desta metodologia. Deste modo, pouco se conhece a respeito do tempo em que os animais permanecem com os testículos deplecionados após essas exposições (Busulfan e/ou a temperatura), bem como o tempo necessário de exposição a esses fatores, para obtenção da depleção por um longo período. Informações estas de extrema importância para garantir o sucesso no transplante e fixação das espermatogônias no receptor.

Todavia, para realizar estudos envolvendo o transplante e a depleção de células germinativas, o primeiro passo é caracterizar a morfologia testicular da espécie que será utilizada. Os diferentes protocolos empregados até o momento nos trabalhos de transplante de células germinativas em peixes evidenciam a necessidade de maior aprofundamento acerca da morfologia testicular. Como resultado da grande diversidade reprodutiva, os peixes apresentam diferentes tipos morfológicos de estruturas gonadais, principalmente se tratando de testículo (PARENTI; GRIER 2004). Nas espécies com fecundação externa, os testículos são órgãos predominantemente pares e alongados, situados no celoma, caudalmente aos rins e dorsalmente ao canal alimentar e sustentados por uma camada fina de peritônio, o mesórquio (SELMAN; WALLACE, 1986; LÊ GAC; LOIR, 1999).

A superfície externa das gônadas é lisa, sendo o seu volume, forma e coloração 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 (GRIER, 1981). O tecido epitelial germinativo ou epitélio germinativo é composto de células de Sertoli e de toda a linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides), apoia-se na membrana basal, e limita uma cavidade ou lúmen (GRIER; LO NOSTRO, 2000; BROWN-PETERSON et al., 2002; PARENTI; GRIER, 2004; RUPIK; HUSZNO; KLAG, 2011).

Nos testículos de peixes, podem ser reconhecidos dois tipos de epitélio germinativo: contínuo e descontínuo (GRIER; TAYLOR, 1998). 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 lóbulos/túbulos. Por outro lado, o epitélio germinativo descontínuo é caracterizado pela perda das células germinativas quando os espermatozoides são expelidos dos espermatocistos. Porém como isto não ocorre uniformemente, na parede do túbulo seminífero alterna-se um epitélio formado apenas por células de Sertoli com regiões contendo o epitélio germinativo típico onde células de Sertoli estão associadas com células germinativas, constituindo desta maneira, um epitélio germinativo descontínuo (GRIER; TAYLOR, 1998; GRIER; LO NOSTRO, 2000; BROWN-PETERSON et al., 2002; VERISSIMO-SILVEIRA, 2003; SIQUEIRA-SILVA et al., 2013).

A distinção dos dois tipos do epitélio germinativo dependendo do estado de maturação gonadal, complementa a tradicional escala de aplicação geral para o período de proliferação testicular proposta por Vazzoler (1981), com base em aspectos macroscópicos, e que é composta basicamente de quatro estágios: imaturo; em maturação; maduro e esvaziado.

Estudos do desenvolvimento gonadal nos teleósteos vêm utilizando os estádios do desenvolvimento das células germinativas presentes no testículo, para descrever as classes de maturação gonadal (BARBIERI et al., 1981; BARBIERI; BARBIERI, 1984; ALEXANDRINO et al., 1985; AZEVEDO et al., 1988; VAZZOLER, 1996; ANTONELI, 1999; ZAIDEN, 2000). Porém, só recentemente, a atividade reprodutiva anual em teleósteos tem sido associada aos estágios das células germinativas presentes e às mudanças no epitélio germinativo (contínuo e descontínuo) (GRIER; TAYLOR, 1998; GRIER; LO NOSTRO, 2000; BROWN-PETERSON et al., 2002; VERISSIMO-SILVEIRA, 2003; SIQUEIRA-SILVA, et. al., 2013).

Com relação à distribuição das espermatogônias, o testículo do tipo lobular pode ainda ser classificado em restrito ou irrestrito (GRIER, et al., 1980). No testículo lobular espermatogonial restrito, as espermatogônias indiferenciadas são observadas somente nas regiões distais do compartimento germinativo, próximas a túnica albugínea, e estão circundadas por células de Sertoli, sendo esse tipo característico das ordens Cyprinodontiformes, Atheriniformes e Beloniformes. No tipo

irrestrito as espermatogônias são distribuídas ao longo do compartimento germinativo por toda extensão do órgão e são encontrados nas ordens Synbranchiformes, Gasterosteiformes, Percopsiformes, Ophidiiformes, Lophiiformes, Polymixiiformes e Perciformes (PARENTI; GRIER, 2004).

De forma a manipular as espermatogônias em transplantes um dos estágios principais é entender como funciona a espermatogênese em teleósteos. Que em sua maioria é dividida em três fases principais: A primeira fase é conhecida como proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por rápidas e sucessivas divisões mitóticas; a segunda fase é chamada de meiótica ou espermatocitária, na qual o material genético é duplicado, recombinação e segregado e a terceira fase conhecida como diferenciação ou espermiogênica, caracterizada por ser a fase em que as espermátides passam por drásticas mudanças morfológicas e fisiológicas para formação dos espermatozoides (SCHULZ et al., 2010). Posteriormente ocorre a espermição, no qual os espermatozoides são liberados para o lúmen do túbulo seminífero, para que posteriormente possa ocorrer a fertilização (SCHULZ, 2003). Nos testículos são encontrados diferentes tipos de células germinativas com estágios sucessivos de espermatogênese: espermatogônias A e B, espermátocitos primário e secundário, espermátides e espermatozoides, sendo que as maiores células dos testículos são as espermatogônias A (GRIER; LO NOSTRO, 2000; BROWN-PETERSON et al., 2002; RUPIK; HUSZNO; KLAG, 2011).

Em Cypriniformes trabalhos recentes vão de encontro ao proposto por Parenti e Grier (2004) que classifica as gônadas desse grupo como do tipo tubular anastomosado com espermatogônias irrestritas e está de acordo com o proposto para peixes Ostariophysi (GRIER et al., 1980; MAACK; SEGNER, 2003; RUPIK; HUSZNO; KLAG, 2011; HUSZNO; KLAG, 2012).

O processo espermatogênico em ciprinídeos, assim como na maioria dos teleósteos, se desenvolve no interior de cistos ou espermatocistos, formados por prolongamentos citoplasmáticos de células de Sertoli que envolve e nutre células germinativas em desenvolvimento sincrônico. Este sincronismo entre as células germinativas de um mesmo cisto é possível devido as citocineses incompletas, sofridas durante as primeiras divisões mitóticas das espermatogônias primárias, que

se mantêm interconectadas por pontes citoplasmáticas (VERISSIMO-SILVEIRA, 2007; RUPIK; HUSZNO; KLAG, 2011).

Em Cypriniformes a espécie mais utilizada em estudos é *Danio rerio*, sendo encontrados diversos trabalhos sobre sua espermatogênese (JAMIESON, 2009; LEAL et al., 2009; NÓBREGA et al., 2009; SCHULZ et al.; 2010; RUPIK; HUSZNO; KLAG, 2011; HUSZNO; KLAG, 2012). Entretanto, são escassos os estudos das demais espécies deste grupo, a exemplo do *Devario aequipinnatus*, um animal de pequeno porte e de fácil cultivo em laboratório, considerado um bom modelo biológico para experimentação. Foi descrito inicialmente em 1839 por J. McClelland, com o nome de *Perilampus aequipinnatus*. Em 1981, a espécie foi reclassificada para o gênero *Danio* onde permaneceu até Fang (2003) em um trabalho de análise filogenética transferi-lo para o gênero *Devario*.

A ordem Cypriniformes é composta de seis famílias, 321 gêneros e cerca de 3.268 espécies. A Família Cyprinidae está entre as maiores famílias de peixes de água doce e sua distribuição abrange a América do Norte (do Norte do Canadá ao Sul do México), a África e a Eurásia. No geral os membros desta ordem são peixes popularmente de aquário. Na América do Norte o nome comum para espécimes da família é “minnow”, enquanto que na Eurásia é “carpa” (NELSON, 2006).

Representantes dessa família se destacam pela importância comercial, servindo como alimento e na aquariofilia, bem como em pesquisas biológicas; dentre esses espécimes estão a Carpa comum (*Cyprinus carpio*), Goldfish (*Carassius auratus*), e o zebrafish (*Danio rerio*) (NELSON, 2006).

Os Dânios como são chamados popularmente, são animais muito ativos, preferindo as regiões média/superior da coluna da água. A temperatura de conforto para espécie em ambiente natural é de 22°C - 24°C (RIEHL; BAENSCH, 1991). Podem chegar até 15 cm de comprimento, sendo os machos um pouco mais coloridos e menores do que as fêmeas (TALWAR, 1991). Por ser um peixe ornamental, representa um excelente modelo experimental para depleção, pelo fato de apresentar rápido crescimento e tamanho relativamente pequeno quando atingem a maturidade sexual. Além disso, é uma espécie simples de se obter, econômica, de fácil manutenção, e possui boa capacidade de aclimação às condições experimentais de laboratório (LELE et al., 1996).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi descrever o ciclo testicular de *Devario aequipinnatus* servindo de base para comparação com qualquer alteração morfológica provocada pelo tratamento e avaliar a eficiência dos tratamentos com Myleran (Busulfan) em conjunto com a temperatura de 30°C, para induzir a depleção das células germinativas em *Devario aequipinnatus*. A fim de que posteriormente essas informações possam ser utilizadas em futuros trabalhos de transplantes de espermatogônias.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, A. C.; PHAN, M. T.; PINHEIRO, E. F. G. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 9, p. 159-175, 1985.
- ANTONELI, F. N. **Acompanhamento histológico e citoquímico das gônadas do tucunaré, *Cichla intermédia*, do Reservatório do Rio Grande – CEMIG, MG.** 1999. 120 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.
- AZEVEDO, C. O.; BARBIERI, M. C.; BARBIERI, G. Ciclo reprodutivo de *Parodon tortuosus* (Eigenmann and Norris, 1900) do rio Passa-Cinco, Ipeúna – SP. I. Estágios de maturação dos testículos. Época de reprodução. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 565-569, 1988.
- BARBIERI, M. C.; BARBIERI, G. Reprodução de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na represa do Lobo (SP). Morfologia e histologia de testículo. Variação sazonal (Pisces, Gymnotidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 141-148, 1984.
- BARBIERI, M. C.; BARBIERI, G.; MARTINS, M. A. Sobre a anatomia e histologia de testículo de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) na represa do Lobo, estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 169-173, 1981.
- BILLARD, R. Attempts to inhibit testicular growth in rainbow trout with Antiandrogens (Cyproterone, Cyproterone Acetate, Oxymetholone) and Busulfan given during the period of spermatogenesis. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 48, n. 1, p. 33-38, 1982.
- BRINSTER, C. J.; RYN B. Y.; AVARBOCK, M. R.; KARAGENC, L.; BRINSTER R. L.; Restoration of fertility by germ cell transplantation requires efficient recipient preparation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, n. 2, p. 412-420, 2003.
- BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Biological Sciences**, Washington, v. 91, n. 24, p. 11298-11302, 1994.
- BRINSTER, R. L.; AVARBOCK M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Biological Sciences**, Washington, v. 91, n. 24, p. 11303-11307, 1994.
- BROWN-PETERSON, N. J.; GRIER, H. J.; OVESTREET, R. M. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n.1, p. 178-202, 2002.

BYERLY, M. T.; FAT-HALLA, S. L.; BETSILL, R. K; PATIN, R. Evaluation of short-term exposure to high temperature as a tool to suppress the reproductive development of channel catfish for aquaculture. **North American journal of aquaculture**, Bethesda, v. 67, n. 4, p. 331–339, 2005.

FANG, F. Phylogenetic analysis of the Asian cyprinid genus *Danio* (Teleostei, Cyprinidae). **Copeia**, Lawrence, v. 2003, n. 4, p. 714–728, 2003.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American zoologist**, Thousand Oaks, v. 21, n. 2, p. 345-357, 1981.

GRIER, H. J.; LINTON, J. R.; LEATHERLAND, J. F.; VLAMING, V. L. Structural evidence for two different testicular types in Teleost fishes. **The American Journal of Anatomy**, Hoboken, v. 159, n. 3, p. 331-345, 1980.

GRIER, H. J.; LO NOSTRO, F. The teleost germinal epithelium: a unifying concept. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6., 2000, Bergen. **Proceedings of the...** Bergen: University of Bergen Press, 2000. p. 233-236.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, London, v. 53, n. 3, p. 521-542, 1998.

HUSZNO, J.; KLAG, J. The reproductive cycle in the male gonads of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae). Stereological analysis. **Micron**, New York, v. 43, n. 5, p. 666–672, 2012.

JAMIESON, B. G. M. **Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Neoteleostomi):** phylogeny-reproductive system-viviparity-spermatozoa. Enfield: Science Publishers, 2009. 252 p.

KIM, Y.; SELVARA, J. V.; DOBRINSKI, I.; LEE, H.; MCENTEE M. C.; TRAVIS, A. J. Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 27, n. 2, p. 248-256, 2005.

LACERDA, S. M. S. N. **Transplante de espermatogônias:** a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. Disponível em: <
http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ICBC-6W6HT2/disserta__o_samyra_nassif.pdf?sequence=1>. Acesso em: 15 abr. 2013.

LACERDA, S. M. S. N. **Transplante Singênico e Xenogênico de espermatogônias-tronco em tilápias-nilóticas (*Oreochromis niloticus*) adultas.** 2010. 102 f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; PEIXOTO, M. T. D.; RESENDE, R. R.; FRANÇA, L. R.

Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. **General and comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v.192, p. 95-106, 2013.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male reproductive system, fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic, 1999. v. 3, p. 20-30.

LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANCA, L. R.; SCHULZ, R. W.; Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 177–187, 2009.

LELE, Z.; KRONE, P. H., The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

MAACK, G.; SEGNER, H. Morphological development of the gonads in zebrafish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 62, n. 4, p. 895–906, 2003.

MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; RAHMAN, S. K. M.; SUZUKI, T.; STRUSSMANN, C. A. Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, n. 7, p. 1162–1172, 2009.

MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; RAHMAN, S. M.; STRUSSMANN, C. A. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. **Plosone**, v. 9, e95294, 2014. Disponível em: < <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0095294> >. Acesso em: 20 out. 2014.

MOLENAAR, R.; DE ROOIJ, D. G.; ROMMERTS, F. F.; REUVERS, P. J.; VAN DER MOLEN, H. J. Specific destruction of Leydig cells in mature rats after in vivo administration of ethane dimethyl sulfonate. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 33, n. 5, p. 1213-1222, 1985.

NELSON J. S. **Fishes of the world**. Hoboken: John Wiley, 2006. 601 p.

NÓBREGA R. H.; GREEBE C. D.; KANT, H. V.; BOGERD J.; FRANCA L. R.; SCHULZ R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **Plosone**, v. 5, n. 9, 2010. Disponível em: < <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0012808> >. Acesso em: 20 out. 2014.

NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology Biochemistry**, New York, v. 35, n.1, p. 197-206, 2009. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-008-9252-z#page-1> >. Acesso em: 12 abr. 2013.

PACCHIARINI, T.; OLAGUE, E.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Busulfan administration produces sublethal effects on somatic tissues and inhibits gametogenesis in Senegalese sole juveniles. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 29, n. 5, p. 619-628, 2014.

PARENTI, R. L.; GRIER, H. J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 44, n.5, p. 333–348, 2004.

RIEHL, R.; BAENSCH H. A. **Aquarien atlas**. Melle: Mergus, Verlag für Natur-und Heimtierkunde. 1991. 992 p.

RUPIK, W.; HUSZNO, J.; KLAG, J. Cellular organisation of the mature testes and stages of spermiogenesis in *Danio rerio* (Cyprinidae; Teleostei)—Structural and ultrastructural studies. **Micron**, New York, v. 42, n.8, p. 833–839, 2011.

SCHULZ R.W. Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. **ARBS Annual Review of Biomedical Sciences**, Botucatu, v. 5, p. 57-58, 2003.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n.3, p. 390-411, 2010.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **American Zoologist**, Thousand, v. 26, n. 1, p. 173-192, 1986.

SHINOHARA, T.; ORWIG, K. E.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Restoration of Spermatogenesis in Infertile Mice by Sertoli Cell Transplantation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 3, p.1064–1071, 2002.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; VICENTINI, C. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Reproductive cycle of the Neotropical cichlid yellow peacock bass *Cichla kelberi*: A novel pattern of testicular development. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 587-596, 2013.

STRUSSMANN C.A.; SAITO T.; TAKASHIMA F. Heat induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 119, n. 2, p. 637–644, 1998.

TALWAR; P. K.; **Inland fishes of India and adjacent countries**. Rotterdam: A. Balkema, 1991. v. 1, 541 p.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleosteos**: teoria e prática. Maringá: Ed. da UEM, 1996.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes; reprodução e crescimento**. Brasília, DF: CNPq, 1981.108 p. (Programa Nacional de Zoologia).

VERÍSSIMO SILVEIRA, R. **Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da subordem Characoidei (Teleostei, Characiformes): uma abordagem filogenética**. 2007. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

VERÍSSIMO SILVEIRA, R. **Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do Dourado (*Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849)**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Faculdade de Ciências Agrária e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P. ; FRANÇA L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 28, n. 1-4, p. 187–190, 2003.

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

1.2 OBJETIVOS

Geral

Avaliar os efeitos da alta temperatura em conjunto com Myleran (Busulfan) na espermatogênese de *Devario aequipinnatus* em condições experimentais.

Específicos

- Descrever o ciclo testicular e a morfologia das células testiculares de *D. aequipinnatus*;
- Promover a depleção da espermatogênese, por meio da droga quimioterápica Myleran (Busulfan), avaliando sua eficácia quando associado a temperatura de 30°C.

2 CAPÍTULO 2 - CICLO TESTICULAR DE *Devario aequipinnatus* (TELEOSTEI, CYPRINIDAE).

Artigo submetido ao Semina: Ciências Agrárias, em 17 de Abril de 2015.

Jumma Miranda Araújo CHAGAS¹, Alexandre NINHAUS-SILVEIRA², Rosicleire VERÍSSIMO-SILVEIRA^{2*}

¹ UNESP - Univ. Estadual Paulista, Ilha Solteira, PPG Ciência e Tecnologia Animal, São Paulo, Brasil. jumma.miranda@gmail.com

²UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira, Departamento de Biologia e Zootecnia, L.I.NEO – Laboratório de Ictiologia Neotropical, Av: Brasil, Centro, 56, 15385-000 Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. ninhaus@bio.feis.unesp.br; rosiverissimo@bio.feis.unesp.br

*Autor para correspondência

Resumo

Devario aequipinnatus, pertencente à família Cyprinidae, é popularmente conhecido como “Dânio” e apresenta um grande potencial como modelo biológico em experimentação animal. Deste modo, o conhecimento da estrutura testicular e a descrição da espermatogênese é de fundamental importância para a caracterização do ciclo reprodutivo da espécie e servindo de subsídios para estudos biotecnológicos. Com esse objetivo, foram utilizados 40 exemplares machos e adultos de *D. aequipinnatus*. Análises histológicas permitiram classificar o testículo de *D. aequipinnatus* em tubular anastomosado com distribuição espermatogonial irrestrita. Foram definidas quatro fases de maturação testicular com base as alterações do epitélio germinativo testicular associada aos estágios das células germinativas presentes: Maturação Inicial, Maturação Intermediária, Maturação Final e Regressão. A Fase de Maturação Inicial é caracterizada pela presença de um epitélio germinativo em sua maioria contínuo, podendo ser encontrado espermatozoides residuais no lúmen tubular, que nesta fase é bem reduzido, e espermatocistos em todos os estágios de desenvolvimento. A Fase de Maturação Intermediária inicia com o surgimento de um epitélio germinativo descontínuo nos túbulos periféricos, com diminuição da espermatogênese e estocagem de espermatozoides. Na região central do testículo o epitélio germinativo se mantém

continuo com a presença de espermatocistos em diferentes estágios de desenvolvimento. Na Fase de Maturação Final a espermatogênese é reduzida e a descontinuidade progride até ser observada em todo o testículo. O lúmen tubular e o ducto testicular estão repletos de espermatozoides. A Fase de Regressão caracteriza-se por apresentar túbulos irregulares, epitélio germinativo descontínuo, com inúmeras espermatogônias primárias, que nesta fase intensificam sua proliferação, repovoando a gônada. São encontrados também alguns cistos de espermatócitos e espermatozoides residuais no lúmen, que nesta fase se encontra reduzido e praticamente desaparece em algumas regiões do epitélio. Ao final desta fase há uma melhor organização dos túbulos e o animal estará pronto para entrar em um novo ciclo reprodutivo, retornando a fase de Maturação inicial. A avaliação histológica testicular permitiu definir que a média dos valores do IGS foi semelhante nas fases de Maturação Intermediária e Final, demonstrando que o *D. aequipinnatus* apresenta várias espemiasções ao longo do período reprodutivo.

Palavras-chave: Fases reprodutivas. Epitélio germinativo. Dânio. Testículo. Peixe.

ABSTRACT

Devario aequipinnatus, belonging to the Cyprinidae family, is popularly known as "Dânio" and has great potential as a biological model for animal experimentation. Thus, knowledge of testicular structure and the description of spermatogenesis is of fundamental importance for the characterization of the reproductive cycle of the species, serving subsidies for biotechnological studies. To this end, we used 40 male adult specimens of *D. aequipinnatus*. Histological analysis allowed to classify testicular *D. aequipinnatus* tubular sutured to unrestricted spermatogonial distribution. Four phases of testicular maturation were defined based on the changes of the testicular germinal epithelium associated with states of germ cells present: Early Maturation, Mid Maturation, Late Maturation and Regression. Starting the maturation phase is characterized by the presence of a germ cell in its most solid, can be found in the tubular lumen sperm waste, which at this stage is very low, and spermatocysts in all stages of development. Phase Intermediate maturation begins with the emergence of a germinal epithelium discontinuous peripheral tubules with impaired spermatogenesis and sperm storage. In the central region of the testis the germinal epithelium remains continue with the presence of spermatocysts at different stages of development. In Phase Late Maturation spermatogenesis is reduced and the discontinuity progress to be observed throughout the testicle. The tubular lumen and testicular duct are filled with sperm. The regression phase is characterized by having irregular tubules, discontinuous germinal epithelium with numerous primary spermatogonia, which at this stage intensify their proliferation, repopulating the gonads. They are also found some cysts of spermatocytes and residual sperm in the lumen, which at this stage is reduced and virtually disappears in some regions of the epithelium. In this stage there is a better organization of the tubules and the animal is ready for a new reproductive cycle, returning early maturation phase. The testicular histological exercise defined than the average GSI values were similar in the stages of maturation Intermediate and Final, demonstrating that *D. aequipinnatus* has several espemias throughout the reproductive period.

Key words: Reproductive phases. germinal epithelium. Dânio. Testis. Fish.

2.1 INTRODUÇÃO

Devario aequipinnatus, pertencente à família Cyprinidae, é conhecido popularmente como “Dânio”, são animais muito ativos, podendo chegar até 15 cm de comprimento, sendo os machos mais coloridos e menores do que as fêmeas (TALWAR, 1991). Apresenta grande potencial como modelo biológico em experimentação animal, por apresentar fácil manutenção e boa capacidade de aclimação às condições laboratoriais (LELE et al., 1996). Entretanto, pouco se conhece a respeito de sua biologia reprodutiva, principalmente, no que diz respeito a morfologia, desenvolvimento testicular e espermatogênese.

Estudos morfológicos das gônadas de teleósteos vem sendo realizado, em muitas espécies de peixes, tendo como objetivo principal identificar aspectos acerca da biologia reprodutiva, como fecundidade, início da maturação reprodutiva, período e duração da reprodução, ciclo reprodutivo gônadal e anual (BARBIERI et al., 1981; BARBIERI; BARBIERI, 1984; ALEXANDRINO et al., 1985; VAZZOLER, 1996; ZAIDEN, 2000; NOBREGA et al., 2010; BROWN-PETERSON et al., 2011; RUPIK et al., 2011; SIQUEIRA-SILVA, et al., 2013), bem como nas relações filogenéticas (PARENTI; GRIER, 2004; QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2006).

A classificação dos testículos dos teleósteos foi proposta por Grier (1993), que definiu dois tipos de organização: testículo tubular anastomosado, no qual os compartimentos germinativos são interconectados, formando uma rede altamente ramificada, que não termina na periferia testicular (presente em teleósteos filogeneticamente mais basais) e testículo lobular, caracterizado pela presença de um epitélio germinativo confinado em compartimentos, que terminam em fundo cego na periferia do testículo. Sendo o segundo tipo presente nos Neoteleósteo filogeneticamente mais derivados (PARENTI; GRIER, 2004).

Para a definição das fases reprodutivas, as alterações do epitélio germinativo testicular, vem sendo utilizado complementarmente a tradicional escala de aplicação geral para o período de proliferação testicular, proposta por Vazzoler (1981). Elas são definidas com base na alternância do epitélio germinativo em contínuo e descontínuo, associado aos estágios das células germinativas no testículo. O epitélio germinativo contínuo é constituído por uma população contínua de células

de Sertoli e células germinativas que se estendem ao longo de todos os túbulos. Por outro lado, o epitélio germinativo descontínuo é caracterizado pela perda das células germinativas quando os espermatozoides são liberados para a luz do túbulo. Esta metodologia vem sendo bastante utilizada, e se mostra eficiente em diversas espécies de peixes (GRIER; TAYLOR, 1998; GRIER; LO NOSTRO, 2000; BROWN-PETERSON et al., 2002; VERISSIMO-SILVEIRA, 2003; SIQUEIRA-SILVA, 2013).

Neste contexto, visando disponibilizar informações que sirvam de subsídios para compreender a biologia reprodutiva da espécie, realizou-se a descrição morfológica testicular de *D. aequipinnatus* ao longo do ciclo reprodutivo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares machos e adultos de *Devario aequipinnatus* (n=40) foram adquiridos em atacadista de peixes ornamentais na região de Uberlândia, Minas Gerais (fig.1). Os exemplares foram anestesiados em solução de benzocaína a 0,5% e sacrificados de acordo com o Protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (11/2013/CEUA). Em seguida foi realizada a biometria de cada exemplar com a mensuração do comprimento total (CT, cm), comprimento padrão (CP, cm), e peso total (PT, g). Para as análises macroscópicas dos testículos, foram observadas a consistência, a coloração e a vascularização das gônadas.

Após anestesiados, os testículos foram extraídos, pesados e seus fragmentos foram fixados “overnight”, em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de Sorensen, pH. 7,2. Em seguida foram desidratados em série crescente de concentração alcoólica e incluídos em resina (Technovit 7100/historesina). Cortes histológicos de 3 µm de espessura foram submetidos as colorações de hematoxilina/eosina (HE), PAS + Metanilyellow + Hematoxilina de Harris. O material histológico foi fotomicrografado no Microscópio Óptico com câmera AXIOCAM MRc5 ZEISS.

Os valores do índice gonadosomático (IGS), dado pelo $IGS = PG/PT \times 100$, onde PG é o peso da gônada e PT é o peso total do peixe (VAZZOLER, 1996), foram calculados para cada peixe e foi usado para estabelecer a curva de maturação

gonadal. Estes dados foram agrupados e analisados separadamente por fases do ciclo reprodutivo e expressos por média e erro padrão.

2.3 RESULTADOS

- Estrutura testicular

Os testículos de *Devario aequipinnatus* são órgãos pares e alongados e se unem formando um ducto espermático que se exterioriza através da papila urogenital (Fig. 2A-C). Estão localizados na região dorsal da cavidade celomática, sendo externamente envoltos por uma túnica albugínea que emite projeções para o interior do testículo formando os compartimentos germinativos do tipo tubular anastomosado (Fig.2D-F). A irrigação sanguínea, volume e coloração variam conforme as fases de desenvolvimento gonadal. O ducto testicular está localizado na periferia testicular e atua como uma área de estocagem de espermatozoides. Os túbulos seminíferos esvaziam seu conteúdo diretamente no ducto testicular principal (Fig.2D).

Em *D. aequipinnatus* a espermatogênese é cística. O epitélio germinativo é constituído por células germinativas e célula de Sertoli, apoiadas em uma membrana basal que reveste o compartimento germinativo e limita uma cavidade ou lúmen (Fig.2E-F). As espermatogônias A-indiferenciadas (Sg Ai), são observadas individualmente ao longo de toda a extensão dos túbulos ou formando agrupamentos espermatogoniais (ninhos), as demais células germinativas se desenvolvem dentro de cistos, formados por projeções citoplasmáticas das células de Sertoli (Fig.3).

Com o desenvolvimento do ciclo reprodutivo são observadas mudanças nas células germinativas e também nas características do epitélio germinativo, que pode ser classificado como contínuo, por apresentar uma população contínua de células de Sertoli e células germinativas que se estendem ao longo de todo o comprimento dos túbulos ou descontínuo, no qual alterna-se um epitélio formado apenas por células de Sertoli com regiões contendo células de Sertoli associadas as células germinativas (Fig.3F).

- Caracterização dos Estágios das células germinativas de *Devario aequipinnatus*

Com relação a morfologia celular, as espermatogônias A-indiferenciadas (Sg Ai) são as maiores células da linhagem germinativa, podendo ser encontradas isoladas e/ou em grupos. Apresentam núcleo volumoso esférico ou ovalado, cromatina pouco granular, com um nucléolo situado na periferia do núcleo, citoplasma bem evidente com grande quantidade de nuages (fig.3A, C, F). A partir de divisões mitóticas as Sg Ai dão origem as espermatogonias A-diferenciadas (Sg Ad), que são células um pouco menores, encontradas em cistos com duas ou três células com desenvolvimento sincrônico, o núcleo é mais basófilo que da célula anterior, com um nucléolo (Fig.3A, F). As espermatogônias B (SgB) são menores, o núcleo é circular e central, sendo mais basófilo quando comparado as espermatogônias A e apresenta um nucléolo pouco evidente (Fig.3B, F).

Os espermatócitos primários (Sc1) originados na última divisão mitótica das SgB, são células menores que seu antecessor, possui um núcleo esférico, basófilo, sua cromatina se apresenta inicialmente difusa variando durante a prófase da primeira divisão meiótica e ausência de nucléolo (Fig.3C, D, F). Ao término da primeira divisão meiótica, ocorre a formação dos espermatócitos secundários (Sc2) que são células menores que os Sc1, o núcleo apresenta um contorno irregular, citoplasma é escasso e a compactação da cromatina é irregular (Fig.3D).

A segunda divisão meiótica é rápida, e dá origem as espermátides (St), que por sua vez são menores que os espermatócitos secundários e apresentam diferentes fases de diferenciação (Fig.3E). Este processo de diferenciação é conhecido por espermiogênese e culmina com a formação dos espermatozoides (Sz) e sua liberação para o lúmen (Fig.3E, F).

- Fases do ciclo Testicular de *Devario aequipinnatus*.

Baseado na metodologia proposta por Grier e Taylor (1998), as alterações no epitélio germinativo associadas aos estágios das células germinativas permitiram a definição de 4 fases de maturação gonadal (Fig. 4).

Maturação inicial: Os testículos apresentam forma filiforme, pouca vascularização sanguínea e são translúcidos. O epitélio germinativo é contínuo podendo ser encontrado também espermatozoides residuais no lúmen tubular que nesta fase é bem reduzido (Fig.5A, B, D). Os túbulos se encontram repletos de espermatocistos contendo células germinativas (espermatogônias B, espermatócitos e espermátides), que se dividem ativamente no decorrer da espermatogênese. Os cistos de espermatócitos primários são os mais frequentes, assim como as espermatogônias A-indiferenciadas que podem ser encontradas isoladas ao longo dos túbulos ou formando agrupamentos espermatogoniais na periferia dos testículos e os cistos de espermátides são raramente observados (Fig.5B-D). A média dos valores do IGS dos indivíduos nesta fase foi em média 0,4 (Fig.9).

Maturação intermediária: Os testículos sofrem um aumento da vascularização sanguínea e até o final da fase atingirá o volume máximo observado para os testículos dessa espécie. Os túbulos estão bem definidos e apresentam na porção periférica o início da descontinuidade no epitélio germinativo, principalmente na região próximo ao ducto testicular, que nesta fase se encontra repleto de espermatozoides (Fig.6A, B). Na região central do testículo o epitélio germinativo se mantém contínuo com a presença de espermatocistos em diferentes estágios de desenvolvimento, espermatogônias A-indiferenciadas isoladas e alguns espermatozoides no lúmen tubular (Fig.6C,D). A média dos valores do IGS dos indivíduos nesta fase foi em média 0,7 (Fig.9).

Maturação final: Os testículos apresentam diâmetro semelhante a fase anterior, pouca vascularização sanguínea e uma coloração esbranquiçada. É caracterizado por apresentar epitélio germinativo totalmente descontínuo, além de um lúmen repleto de espermatozoides (Fig.7). No início desta fase são encontrados escassos cistos de células germinativas e com o avanço do desenvolvimento gonadal a espermatogênese se torna mínima e a descontinuidade progride até ser observada em todo o testículo (Fig.7B-D). O ducto testicular atua estocando um grande volume de espermatozoides (Fig.7B). A média dos valores do IGS dos indivíduos nesta fase foi em média 0,7 (Fig.9).

Regressão: Esta fase é caracterizada por várias alterações na morfologia testicular; os testículos apresentam grande vascularização sanguínea, textura flácida

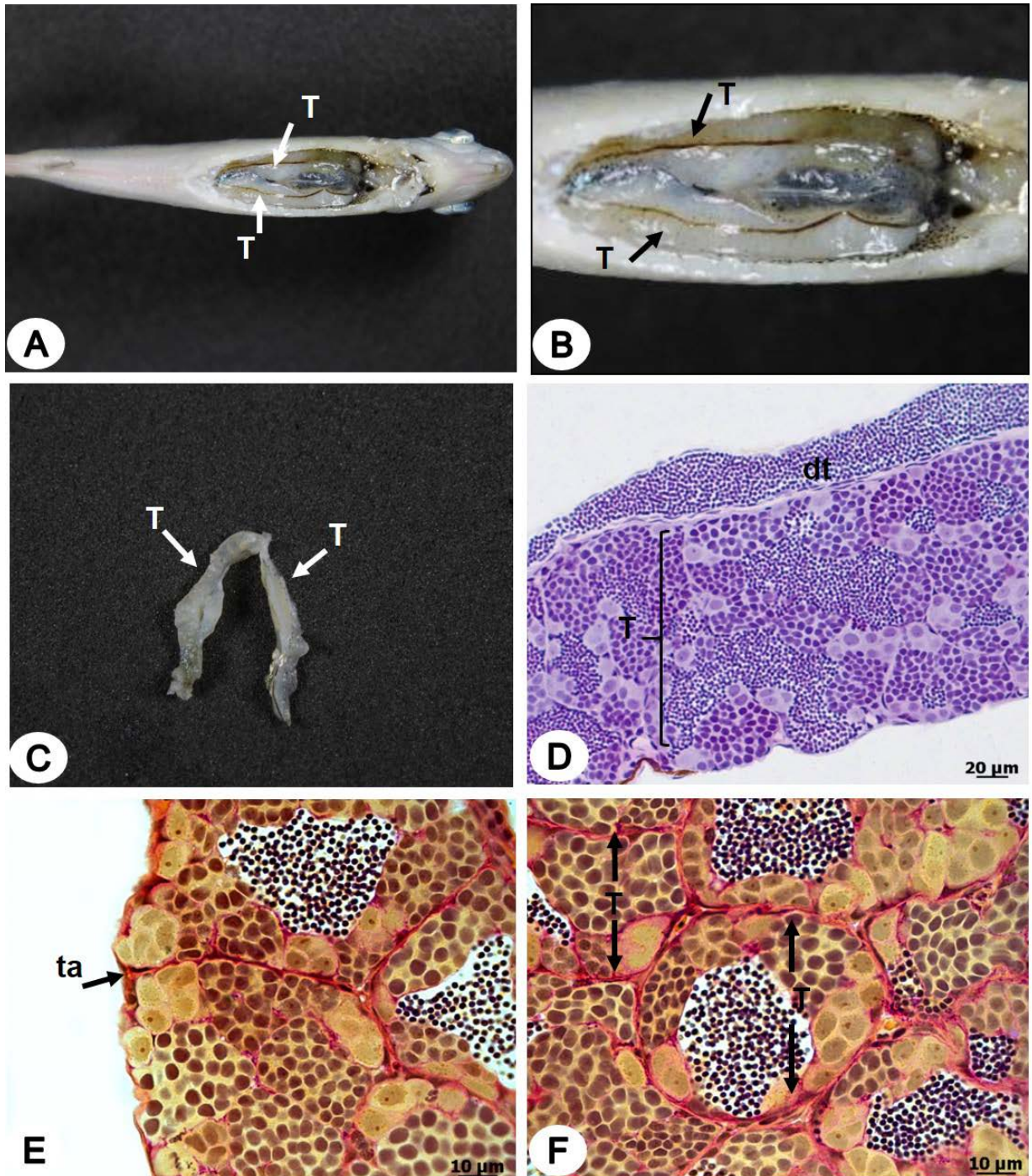
e volume muito menor que na fase anterior. No início desta fase há uma grande proliferação mitótica de espermatogônias A-indiferenciadas ao longo do epitélio germinativo, originando novos cistos espermatogênicos (Fig.8A). Os túbulos são irregulares e possuem escassos cistos de espermatócitos (Fig.8B). Espermatozoides residuais estão presentes no lúmen, que nesta fase se encontra reduzido e praticamente ausentes em algumas regiões do testículo (Fig.8B-D); as células de Sertoli auxilia no processo de reestruturação gonadal, com uma provável fagocitose dos corpos residuais do ciclo reprodutivo anterior (Fig.8C). Ao final desta fase há uma organização dos túbulos e o animal estará pronto para entrar em um novo ciclo reprodutivo, retornando a fase de Maturação inicial. A média dos valores do IGS dos indivíduos nesta fase foi em média 0,5 (Fig.9).

Figura 1 – Exemplar adulto macho de *Devario aequipinnatus*. (Escala 1cm)



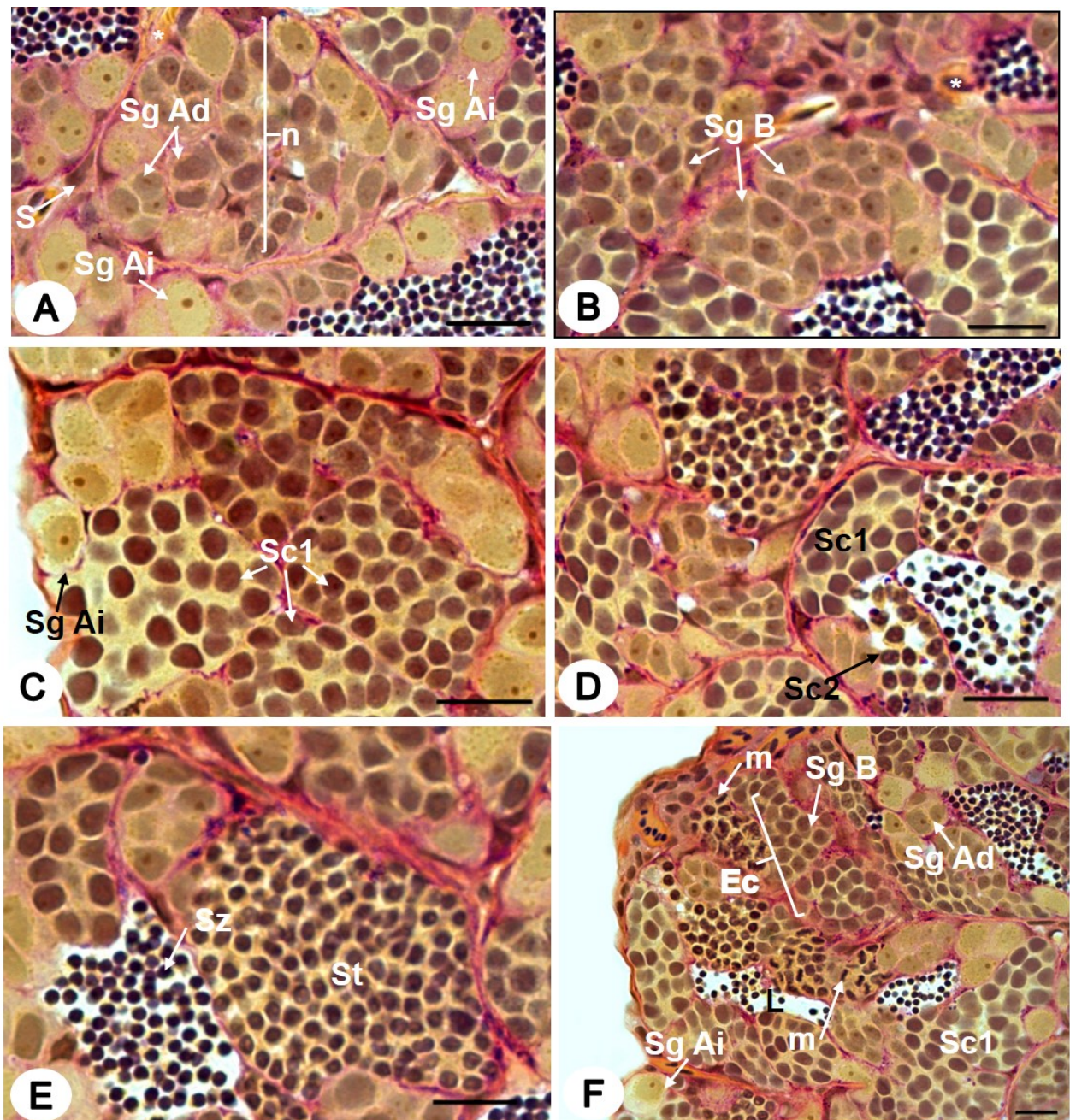
Fonte: própria autora

Figura 2 – Morfologia testicular de *Devario aequipinnatus*. **A,B**: Anatomia dos testículos na cavidade celomática. **C**: Anatomia dos testículos isolados. **D**: Corte longitudinal evidenciando a estrutura testicular do tipo tubular anastomosado e o ducto testicular (**dt**). **E,F**: Corte longitudinal da região periférica gonadal, mostrando a formação dos túbulos testiculares (**T**), formados por projeções da Túnica Albugínea (**Ta**). **Coloração**: **D**– Hematoxilina de Harris/Eosina; **E,F** – PAS + Metanilyellow + Hematoxilina de Harris; **A,B** – Peixe 5,5 cm; **C** – Testículo 1,3 cm.



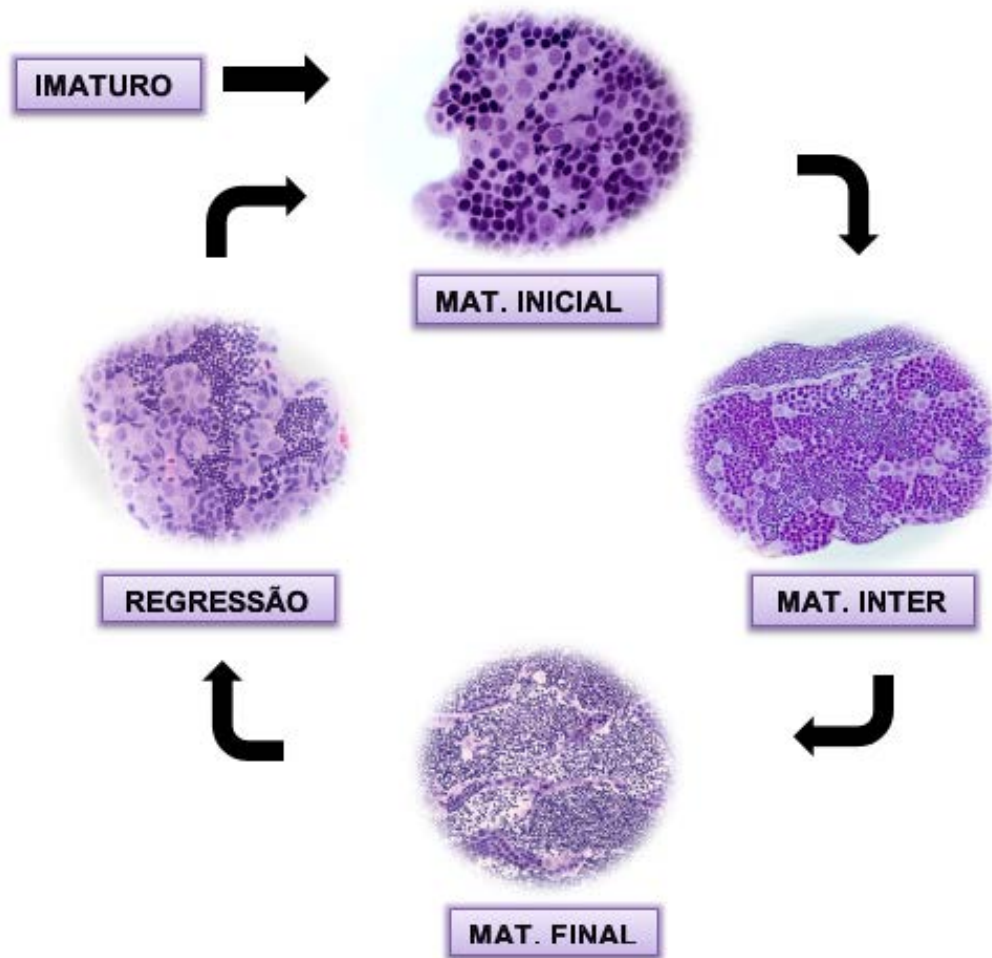
Fonte: própria autora

Figura 3 – Espermatogênese em *Devario aequipinnatus*. **A:** Distribuição espermatogonial. Espermatogônias A-indiferenciadas (**Sg Ai**) e A-diferenciada (**Sg Ad**). **B:** Cistos de espermatogônias B (**Sg B**). **C:** Espermatogônias A-indiferenciadas (**Sg Ai**) em meio a cistos de espermatócitos primários (**Sc1**). **D:** Cisto de Espermatócitos secundários (**Sc2**). **E:** Cisto de espermátide (**St**) e espermatozoides (**Sz**) no lúmen tubular. **F:** Cistos de espermatócitos primário em diferentes fases da primeira divisão meiótica com detalhe para as células em metáfase (**m**). (**n**) ninhos espermatogoniais. (**St**) Espermátides, (**Ec**) Epitélio germinativo contínuo, (**S**) Células de Sertoli; (**L**) Lúmen; (*) Vasos sanguíneos. **Coloração:** PAS + Metanilyellow + Hematoxilina de Harris. Cortes longitudinais.



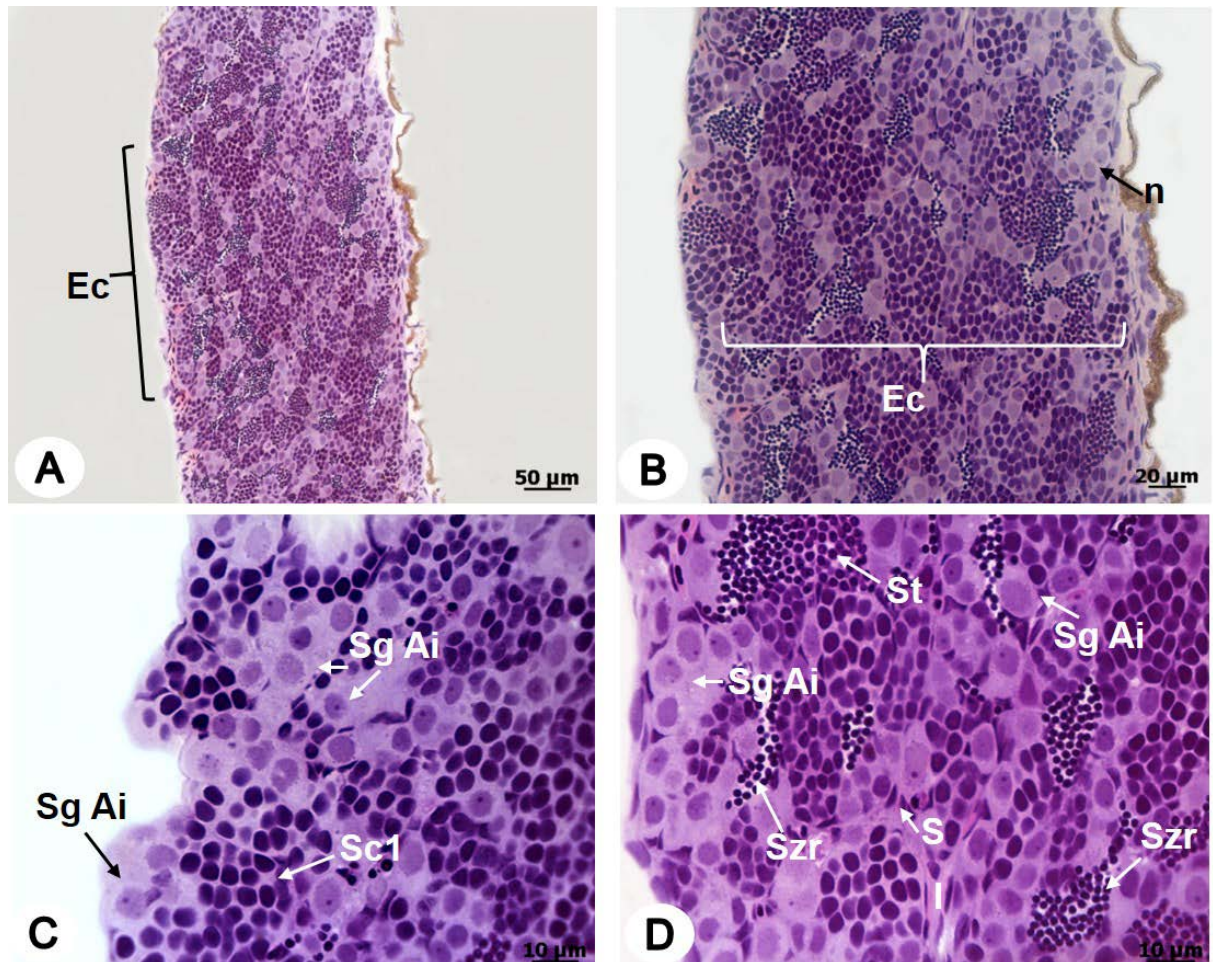
Fonte: própria autora

Figura 4 – Dinâmica do ciclo reprodutivo de *Devario aequipinnatus*.



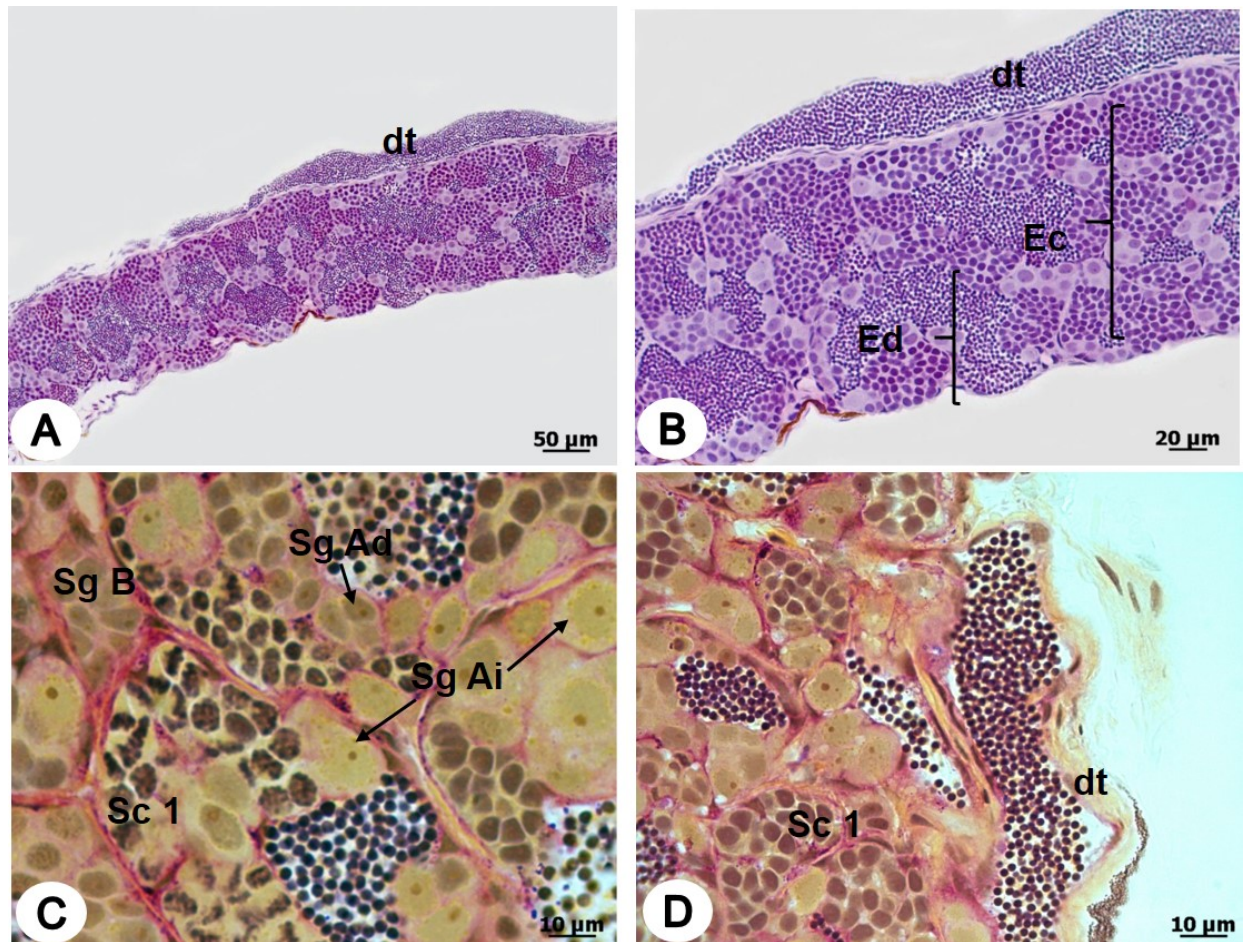
Fonte: própria autora

Figura 5 – Características estruturais do estágio inicial de desenvolvimento gonadal, referente a Fase de Maturação Inicial em *Devario aequipinnatus*. **A:** Testículo com epitélio germinativo contínuo (**Ec**). **B,C,D:** Túbulos com epitélio germinativo contínuo e cistos de células germinativas em diferentes fases da espermatogênese. (**S**) Células de Sertoli; (**n**) ninho; (**Sg Ai**) Espermatogônia A-indiferenciada; (**Szr**) Espermatozóides residuais; (**Sc1**) Espermatócito primário; (**St**) espermátides; (**I**) Interstício; **Coloração:** Hematoxilina de Harris/Eosina.



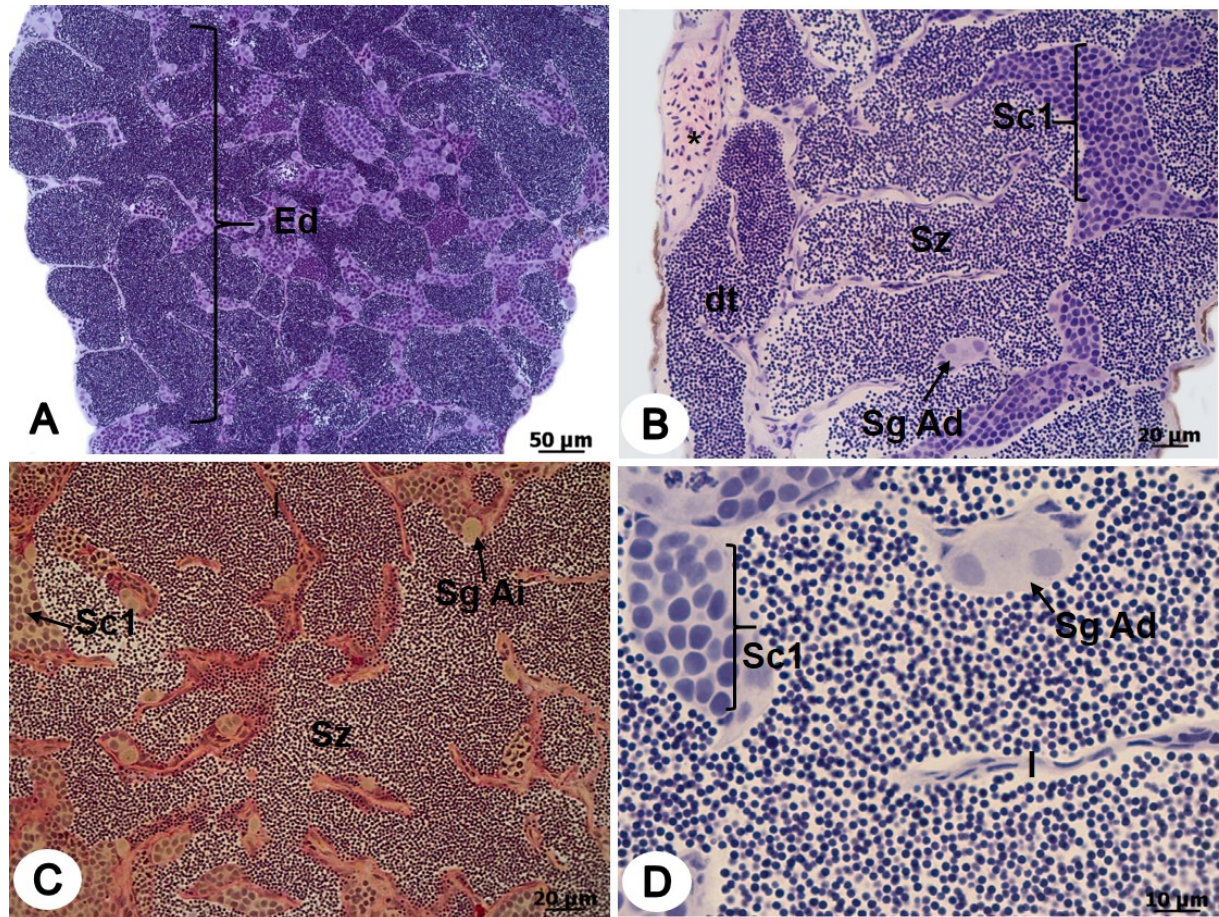
Fonte: própria autora

Figura 6 – Características estruturais do estágio de desenvolvimento gonadal, referente a Fase de Maturação Intermediária em *Devario aequipinnatus*. **A, B:** Ducto testicular estocando espermatozoides em sua luz (**dt**), Início da descontinuidade do epitélio germinativo (**Ed**), porém ainda são encontrados muitos espermatocistos e alguns túbulos com epitélio germinativo contínuo (**Ec**). **C, D:** Início da descontinuidade do epitélio germinativo em meio a espermatocistos. (**Sg Ai**) Espermatogônia A-indiferenciada; (**Sg Ad**) Espermatogônia A-diferenciada; (**SgB**) Cisto de espermatogônias B; **Sc1:** Espermatócito primário; **Coloração:** **A, B** – Hematoxilina de Harris/Eosina; **C, D** – PAS + Metanilyellow + Hematoxilina de Harris.



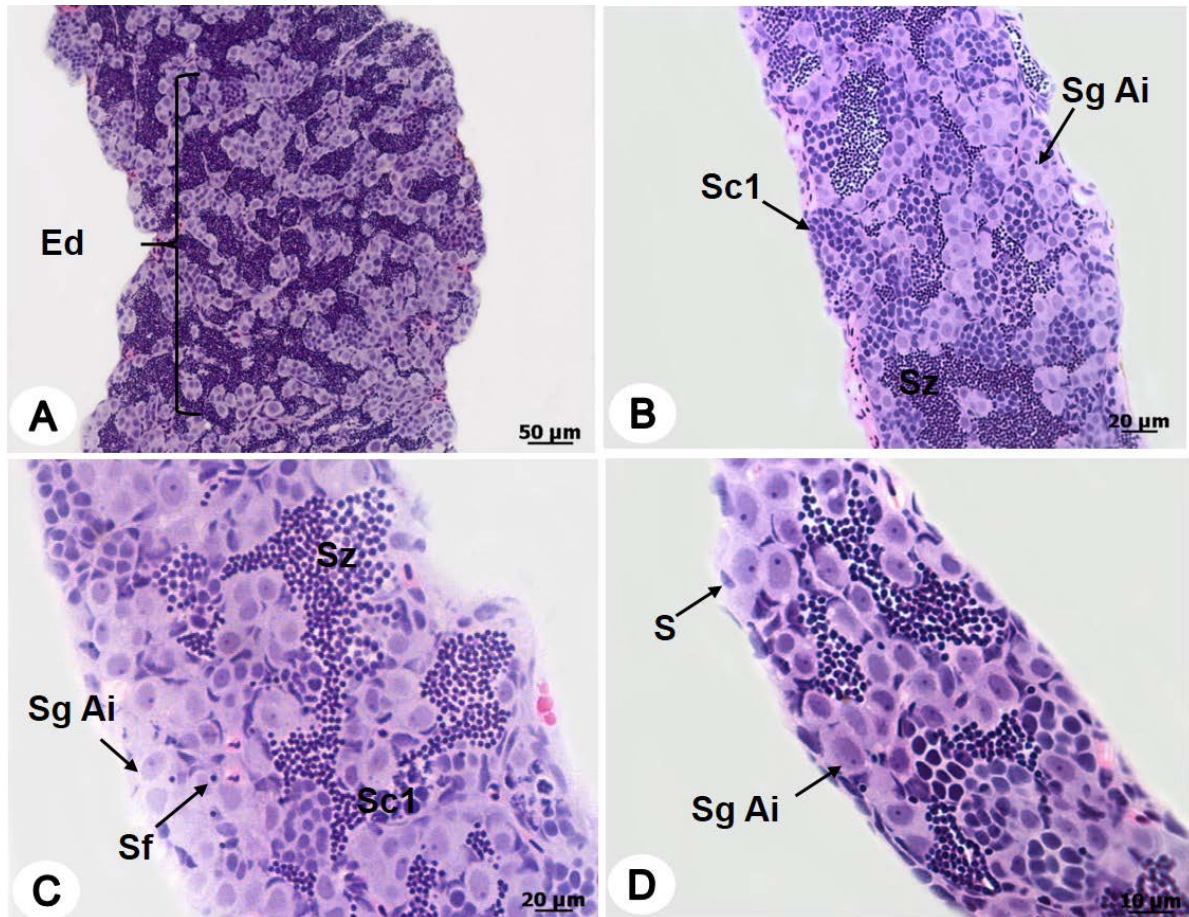
Fonte: própria autora

Figura 7 – Características estruturais do estágio de desenvolvimento gonadal, referente a Fase de Maturação Final em *Devario aequipinnatus*. **A:** Corte longitudinal do testículo evidenciando a descontinuidade do epitélio (**Ed**). **B:** Ducto testicular (**dt**) e lúmen repleto de espermatozoides (**Sz**); Apesar da descontinuidade do epitélio é possível visualizar cistos de espermatócitos primário (**Sc1**); **C, D:** Corte em maior aumento evidenciando a presença de espermatozoides (**Sz**) no lúmen. Espermatogônia A-indiferenciada (**Sg Ai**) e Espermatogônia A-diferenciada (**Sg Ad**); (**I**) Interstício; (*) Vaso sanguíneo. **Coloração:** **A, B, D**– Hematoxilina de Harris/Eosina; **C** – PAS + Metanilyellow + Hematoxilina de Harris.



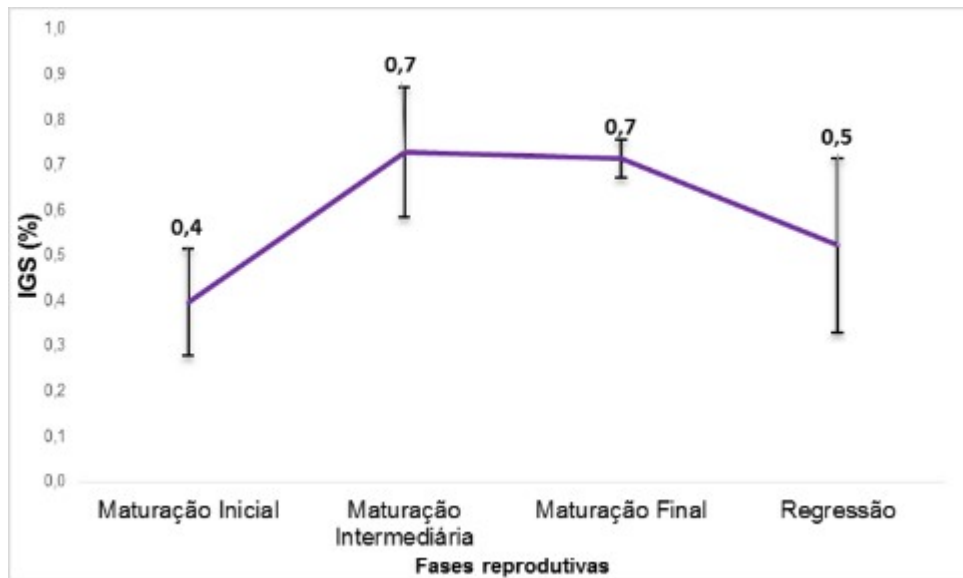
Fonte: própria autora

Figura 8 – Características estruturais da Fase de Regressão em *Devario aequipinnatus*. **A:** Há uma grande proliferação de (**Sg Ai**) espermatogônias A-indiferenciadas e o epitélio germinativo se mantém descontínuo (**Ed**). **B:** A gônada diminui consideravelmente de tamanho adquirindo uma aparência flácida, com túbulos irregulares, muitas espermatogônias e alguns cistos de espermatócitos primários (**Sc1**). **C,D:** Corte longitudinal de uma gônada em processo de reestruturação com detalhe para célula de Sertoli fagocitando uma célula residual (**Sf**). (**S**) Células de Sertoli; **Sz**: Espermatozóide; **Coloração:** Hematoxilina de Harris/Eosina.



Fonte: própria autora

Figura 9 – Índice gonadosomático (IGS) relacionando as fases de maturação testicular em *Devario aequipinnatus*.



Fonte: própria autora

2.4 DISCUSSÃO

Estudos sobre a estrutura testicular em teleósteos demonstram que apesar da diversidade de espécies são encontrados apenas dois tipos de organização testicular, o tubular anastomosado e o lobular (GRIER, 1993). A caracterização morfológica do testículo de *D. aequipinnatus* como tubular anastomosado está filogeneticamente de acordo com os resultados de Parenti & Grier, (2004) que propõem que este tipo testicular está presente em grupos mais basais, como em Characiformes (VICENTINI et al., 2001; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003; NÓBREGA; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2007; MUÑOZ et. al., 2011), Siluriformes (OLIVEIRA-JUNIOR, 2003) e Cypriniformes (LEAL et al., 2009; RUPIK; HUSZNO, 2011; HUSZNO; KLAG, 2012).

A distribuição das espermatogônias nos testículos de *D. aequipinnatus*, o define como espermatogonial irrestrito, similar ao descrito em Siluriformes (QUAGIO-GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999; BATLOUNI et al., 2006), Characiformes (VICENTINI et al., 2001; MUÑOZ et. al., 2011) e Cypriniformes (LEAL et. al., 2009; RUPIK; HUSZNO, 2011; HUSZNO; KLAG, 2012). Característica esta encontrada tanto em espécies com testículos do tipo lobular, como em espécies com testículo do tipo tubular (GRIER; TAYLOR, 1998; VICENTINI et al., 2001; BROWN-PETERSON, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003; SIQUEIRA-SILVA et al., 2013).

Em *D. aequipinnatus* a espermatogênese é cística, característica muito comum entre os anamniotas (peixes e anfíbios) (NOBREGA et al., 2009; SCHULZ et al., 2010). No entanto, algumas espécies como *Bryconops affinis* (ANDRADE et al., 2001), *Scorpaena notata* (MUÑOZ et al., 2002) e *Malapterurus electricus* (SHAHIN, 2006), apresenta espermatogênese semi-cística, onde as células germinativas, espermatócitos e principalmente espermátides não completam seu desenvolvimento no interior dos cistos, sendo liberados no lúmen antes de atingirem o estágio de espermatozoide (LE GAC; LOIR, 1999; MUÑOZ et al., 2002).

A descrição de diferentes tipos espermatogônias, com base nas características morfológicas, foi inicialmente descrito para *Danio rerio*, sendo definido dois tipos de Espermatogônias A indiferenciada (LEAL et al., 2009; SCHULZ et al., 2010; NOBREGA et al., 2010). Entretanto, em *D. aequipinnatus* está variação morfológica

nas espermatogônias A-indiferenciadas não foi evidente, não sendo possível adotar esta nomenclatura.

As fases reprodutivas em *D. aequipinnatus*, podem ser facilmente distinguidas por critérios histológicos e são semelhantes ao proposto inicialmente por Grier e Taylor (1998), para definição do ciclo reprodutivo anual de *Centropomus undecimalis*, no qual as fases reprodutivas foram descritas detalhadamente com base nas alterações histológicas do epitélio germinativo, associadas aos estágios de desenvolvimento das células germinativas. Posteriormente, diversos autores, entre eles, Brown Peterson; Warren (2001), Brown Peterson et al. (2002) e Nóbrega (2003) também utilizaram esta nomenclatura para descrever as fases de maturação gonadal, indicando que a classificação gonadal baseada nesta proposta, provavelmente, se aplicaria a uma variedade de peixes (BATLOUNI et. al., 2006).

Entretanto, na fase de maturação inicial em *D. aequipinnatus* são encontrados alguns espermatozoides no lúmen tubular, possivelmente esta característica está relacionada ao fato de que os animais analisados não liberaram os gametas para o meio externo e a sua reabsorção pode se estender até o início do próximo ciclo, este fato também foi observado por Huszno e Klag (2012) em *Danio rerio*.

O epitélio germinativo descontínuo surge inicialmente na porção periférica do testículo de *D. aequipinnatus* e com o final da maturação, a descontinuidade progride para região central do testículo. Esta característica também foi observada em *Sorubim lima* (QUAGIO-GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999) e *Salminus maxillosus* (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003), ambos apresentando o testículo do tipo tubular anastomosado. Diferentemente do observado nas espécies que apresentam testículo do tipo lobular, como observado em *Symbranchus marmoratus* (LO NOSTRO et al., 2003), *Centropomus undecimalis* (GRIER; TAYLOR, 1998) e *Cichla kelberi* (SIQUEIRA-SILVA et al., 2013), o epitélio germinativo descontínuo tem origem na região proximal dos lóbulos e se mantém contínuo na parte periférica do testículo, até o avanço do ciclo reprodutivo.

A fase Regredida, foi classificada por Grier e Taylor (1998), na qual são observadas somente espermatogônias ao longo do epitélio germinativo, estando estas em proliferação para repor o epitélio e dar continuidade ao próximo ciclo reprodutivo. Entretanto *D. aequipinnatus* reúne em uma mesma fase, a regressão e

a regredida, no qual estão presentes inúmeras espermatogônias, alguns cistos de espermatócitos e alguns espermatozoides residuais; tendo como característica a fagocitose de corpos residuais e a proliferação espermatogonial, o que também foi observado em *Cichla ocellaris* (MAGALHÃES et al., 1996) e *Cichla kelberi* (SIQUEIRA-SILVA et al., 2013).

Os valores de IGS ao longo do ciclo reprodutivo de *D. aequipinnatus*, demonstram uma característica reprodutiva semelhantes a das espécies que apresentam várias espemiasções ao longo do período reprodutivo, atingindo o ápice nas fases de maturação intermediária e maturação final e juntamente com as análises histológicas se mostra uma ferramenta importante para interpretação correta das fases reprodutivas (BREWER; RABENI; PAPOULIAS, 2008).

2.5 CONCLUSÕES

Devario aequipinnatus apresenta testículo do tipo tubular anastomosado com espermatogênese cística e distribuição de espermatogônias irrestrita. Utilizando as alterações do epitélio germinativo e as características das células germinativas, foi possível definir quatro fases de desenvolvimento gonadal: Maturação inicial, Maturação intermediária, Maturação Final e Regressão. A avaliação histológica testicular permitiu definir que a média dos valores do IGS foi semelhante nas fases de Maturação Intermediária e Final, demonstrando que o *D. aequipinnatus* apresenta várias espemiasções ao longo do período reprodutivo.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Douglas de Castro Ribeiro, Diógenes Henrique de Siqueira Silva e a Raphael da Silva Costa pela colaboração durante o estudo e desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, A. C.; PHAN, M. T.; PINHEIRO, E. F. G. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 9, p. 159-175, 1985.
- ANDRADE, R. F.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. SATO, Y. Continuous gametogenesis in the Neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces:Characidae). **Tissue & Cell**, Essex, v. 33, n. 5, p. 524-532, 2001.
- BARBIERI, M. C.; BARBIERI, G. Reprodução de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na represa do Lobo (SP). Morfologia e histologia de testículo. Variação sazonal (Pisces, Gymnotidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 141-148, 1984.
- BARBIERI, M. C.; BARBIERI, G.; MARTINS, M. A. Sobre a anatomia e histologia de testículo de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) na represa do Lobo, estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 169-173, 1981.
- BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive Cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei: Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 116-132, 2006.
- BREWER, S. K.; RABENI, C. F.; PAPOULIAS D. M. Comparing histology and gonadosomatic index for determining spawning condition of small-bodied riverine fishes. **Ecology of Freshwater Fish**, Malden, v. 17, n. 1, p. 54-58, 2008.
- BROWN-PETERSON, N. J. The reproductive biology of spotted seatrout. In: BORTONE, S. **Biology of the spotted seatrout**. New York: CRC, 2003. p. 99–134.
- BROWN-PETERSON, N. J.; GRIER, H. J.; OVESTREET, R. M. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n.1, p. 178-202, 2002.
- BROWN-PETERSON, N. J.; WARREN, J. W. The Reproductive biology of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*, along the Mississipp Gulf Coast. **Gulf of Mexico Science**, Dauphin Island, v. 19, n. 1, p. 61-73, 2001.
- BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, Bethesda, v. 3, n. 1, p. 52–70, 2011.
- GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cells barrier. In: RUSSELL, Id., GRISWORLD, M.D. **The sertoli cell**. Clearwater: Cache River Press, 1993. p. 704-739, 1993.

GRIER, H. J.; LO NOSTRO, F. The teleost germinal epithelium: a unifying concept. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6, 2000, Bergen. **Proceedings of the...** Bergen: University of Bergen Press, 2000. p. 233-236.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, London, v. 53, n. 3, p. 521-542, 1998.

HUSZNO, J.; KLAG, J. The reproductive cycle in the male gonads of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae). Stereological analysis. **Micron**, New York, v. 43, n. 5, p. 666–672, 2012.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male reproductive system, fish. In: KNOBIL, E. ; NEILL, J. D. (Ed.). **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press. v. 3, p. 20-30, 1999.

LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANCA, L. R.; SCHULZ, R. W.; Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 177–187, 2009.

LELE, Z.; KRONE, P. H., The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

LO NOSTRO, F. L.; GRIER, H.; MEIJIDE, F. J.; GUERRERO, G. A. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Synbranchidae): the germinal compartment. **Tissue & Cell**, Essex, v. 35, n. 2, p. 121-132, 2003.

MAGALHÃES, A. L. B.; SATO, Y.; RIZZO, E.; FERREIRA, R. M. A.; BAZZOLI, N. Ciclo reprodutivo do tucunaré *Cichla ocellaris* (Schneider, 1801), na represa de Três Marias, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, n. supl. 1, p. 85-92, 1996.

MUÑOZ, M. E.; BATLOUNI S. R.; VICENTINI, I. B. F.; VICENTINI, C. A. Testicular structure and description of the seminal pathway in *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae, Teleostei). **Micron**, New York, v. 42, n.8, p. 892-897, 2011.

MUÑOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET, S. Testicular structure and semicystic spermatogenesis in a specialized ovuliparous species: *Scorpaena notata* (Pisces, Scorpaenidae). **Acta Zoologica**, Chichester, v. 83, v. 3, p. 213–219, 2002.

NÓBREGA R. H.; GREEBE C. D.; KANT, H. V.; BOGERD J.; FRANCA L. R.; SCHULZ R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **Plosone**, v. 05, n. 9, 2010. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0012808>>. Acesso em: 20 out. 2014.

NOBREGA, R. H. **Capacidade suporte das células de Sertoli e alterações do epitélio germinativo masculino e do tecido intersticial durante o ciclo**

reprodutivo de peixes neotropicais. 2003. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, 2003.

NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology Biochemistry**, New York, v. 35, n.1, p. 197-206, 2009. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-008-9252-z#page-1>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

NOBREGA, R. H.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Morphofunctional changes in Leydig cells throughout the continuous spermatogenesis of the freshwater teleost fish, *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes, Characidae): an ultrastructural and enzyme study. **Cell Tissue Research**, Heidelberg, v. 329, n.2, p. 339-349, 2007.

OLIVERA JUNIOR, R. L. **Análise comparativa da reprodução do Mandi-amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces, Pimelodidae), em dois trechos do rio São Francisco, MG**. 2003. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003. Disponível em: < <http://www.nucleodeaprendizagem.com.br/pimelodusmaculatus.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2014.

PARENTI, R. L.; GRIER, H. J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 44, n.5, p. 333–348, 2004.

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

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

RUPIK, W.; HUSZNO, J.; KLAG, J. Cellular organisation of the mature testes and stages of spermiogenesis in *Danio rerio* (Cyprinidae; Teleostei)—Structural and ultrastructural studies. **Micron**, New York, v. 42, n. 8, p. 833–839, 2011.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 3, p. 390-411, 2010.

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

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; VICENTINI, C. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Reproductive cycle of the Neotropical cichlid yellow peacock bass

Cichla kelberi: A novel pattern of testicular development. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 587-596, 2013.

TALWAR; P. K.; **Inland fishes of India and adjacent countries**. Rotterdam: A. Balkema, 1991. v. 1, 541 p.

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

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

VERÍSSIMO SILVEIRA, R.; GUSMÃO-POMPIANI, P.; VICENTINI, C. A.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoológica**, Stockholm. v. 87, n. 4, p. 305-313, 2006.

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

VICENTINI, C. A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; BENETTI, E. J.; ORSI, M. Testicular ultrastructure and morphology of the seminal pathway in *Prochilodus scrofa*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, Bologna, v. 33, n.3, p. 357-362, 2001.

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

3 CAPÍTULO 3 – SUPRESSÃO DA ESPERMATOGÊNESE EM *Devario aequipinnatus* (TELEOSTEI, CYPRINIDAE).

RESUMO

A supressão da espermatogênese é uma técnica aplicável na obtenção de quimeras germinativas utilizando células tronco espermatogoniais. Consiste na eliminação das células germinativas endógenas do testículo de um receptor, para que posteriormente o testículo do receptor seja capaz de abrigar as células tronco espermatogoniais de um animal doador, onde possivelmente estas células irão se desenvolver formando espermatozoides maduros com características genéticas do doador. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi promover experimentalmente a depleção da espermatogênese endógena do *Devario aequipinnatus*, um modelo biológico, com a utilização do Busulfan e sua associação com a temperatura de 30°C. Foram realizados os seguintes tratamentos: 1) T15/18 – com aplicações de duas injeções, com intervalo de 10 dias entre as mesmas, sendo a primeira dose de 15 mg de Busulfan por Kg de peixe e a segunda com 18 mg de Busulfan por Kg de peixe; 2) T40 - com uma injeção contendo 40 mg/kg de Busulfan. Como grupo controle, foi utilizado uma unidade experimental com 30 animais, sem a inclusão de qualquer tipo de droga, permanecendo sob as mesmas condições de temperatura, alimentação e fotoperíodo, que os demais nos diferentes tratamentos. Não houve mortalidade dos animais em nenhum dos tratamentos analisados. Os animais que receberam o tratamento com Busulfan apresentaram redução na quantidade de Espermatócitos. Essa redução foi mais acentuada no T40 que apresentou um efeito mais duradouro quando comparado ao T15/18. Ocorreu também um aumento na quantidade de lúmen no T40 principalmente nas coletas 1 e 3. Na primeira coleta após a aplicação do Busulfan (coleta 1 e coleta 4) houve um aumento na quantidade de picnose nas espermatogônias A- ind, na coleta 1 esse aumento foi maior no T40 e na coleta 4, devido a 2ª dose do Busulfan, esse aumento foi maior no T15/18. Foram observadas a fase de maturação final em todos os tratamentos de todas as coletas, no entanto, a quantidade de cistos germinativos nos tratamentos com Busulfan foram muito inferiores quando comparados ao controle ou ausentes em alguns exemplares. Deste modo, o T40 se mostrou mais eficiente por prolongar o efeito do Busulfan e em alguns casos eliminar completamente os cistos germinativos, restando apenas espermatozoides no lúmen tubular.

Palavras-chave: Transplante. Testículo. Espermatogônias. Biotecnologia. Dânio.

ABSTRACT

The suppression of spermatogenesis is an applicable technique for obtaining germ cell chimeras using spermatogonial stem. Is the elimination of endogenous germ cells of the testis of a receiver, so that later the receiver of the testis is able to house the spermatogonial stem cells from a donor animal, possibly where these cells will develop to form mature sperm with genetic characteristics of the donor. Thus, the objective of this work was experimentally promote depletion of endogenous spermatogenesis of *Devario aequipinnatus*, a biological model, with the use of Busulfan and its association with the 30 ° C. The following treatments were used: 1) T15 / 18 - Application with two injections with an interval of 10 days between them, the first dose being 15 mg per kg of Busulfan fish and the second with 18 mg per kg of Busulfan fish; 2) T40 - with an injection containing 40 mg / kg of Busulfan. As a control group, an experimental unit with 30 animals was used, in the absence of any type of drug, staying under the same conditions of temperature, photoperiod and feeding, the other in the different treatments. There was no mortality of animals in any of the treatments. The animals that received treatment with Busulfan had reduced amount of spermatocytes. This reduction was more pronounced in T40 that had a more lasting effect when compared to T15 / 18. Also there was an increase in the amount of lumen in T40 mainly in collections 1 and 3. In the first collection after application of Busulfan (1 collection and collection 4) there was an increase in the amount of pyknosis in spermatogonia A-ind, in collecting 1 this increase was higher in T40 and gathering 4 due to 2nd dose of Busulfan, this increase was higher in T15 / 18. The final ripening stage were observed in all treatments of all samples, however, the number of cysts in the germinal Busulfan treatments were much lower compared to the control or absent in some samples. Thus, T40 is more efficient to prolong the effect of Busulfan and in some cases completely eliminate the germinal cysts, sperm leaving only the tubular lumen.

Keywords: Transplant. Testis. Spermatogonia. Biotechnology. Dânio.

3.1 INTRODUÇÃO

A depleção da espermatogênese é uma das técnicas utilizadas em transplantes de espermatogônias. Foi usada inicialmente por Brinster e Avarbock (1994) e Brinster e Zimmermann (1994) em camundongos e consiste na supressão da espermatogênese no testículo de um receptor, para que posteriormente este testículo seja capaz de abrigar as células tronco espermatogoniais de um animal doador, onde possivelmente estas células irão se desenvolver formando espermatozóides maduros com características genéticas do doador. Esta técnica vem proporcionando grandes avanços no estudo do processo espermatogênico (SHINOHARA et al., 2002; BRINSTER et al., 2003), sendo bastante difundida em vertebrados (BRINSTER et al., 2003; SHINOHARA et al., 2002; BRINSTER; AVARBOCK, 1994; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994; FANG-XU JIANG, 1998; KIM et al., 2005; OGAWA et al., 1999).

Em peixes, foram utilizados para esta finalidade técnicas como triploidização (YOSHIZAKI et al., 2011), hipertermia (STRUSSMAN et al., 1998), radiação (KIM et al., 2005) e a utilização de drogas quimioterápicas (BILLARD, 1982; LACERDA, 2006; HONARAMOOZ et al., 2005). 2010; MAJHI et al., 2009; NOBRÉGA et al., 2010; LACERDA et al., 2013; PACCHIARINI, 2014; MAJHI et al., 2014). Dentre as drogas quimioterápicas, a mais utilizada com a finalidade de que ocorra a depleção das células germinativas é o Busulfan, um agente quimioterápico, alquilante e citostático (MOLENAAR et al., 1985).

Os efeitos citotóxicos do Busulfan (1,4-dimetanosulfonoxibutano) se devem, principalmente, a promoção de ligações cruzadas no DNA através da transferência de radicais alquil aos nucleotídeos, as quais levam a morte massiva das células com grande capacidade proliferativa como, por exemplo, as espermatogônias. A dose efetiva de Busulfan varia entre as espécies e até mesmo entre linhagens, podendo ser letal em função de severa depressão funcional da medula óssea (BRINSTER et al., 2003; HONARAMOOZ et al., 2005; LACERDA, 2006). O Busulfan vem sendo muito utilizado, pois elimina as células da linhagem germinativa, sem prejudicar as células de Sertoli, que são necessárias à formação dos cistos espermatogênicos (BRINSTER et al., 2003).

No entanto, estudos apenas com Busulfan não se mostraram tão eficientes para eliminar células germinativas em peixes como se mostraram em mamíferos (BILLARD, 1982), este fato pode estar relacionado a diferenças com relação à

temperatura corporal. No entanto, estudos que associaram Busulfan com altas temperatura, obtiveram resultados significativos quando em conjunto com temperaturas elevadas (LACERDA, 2006; 2010; MAJHI et al 2009; NOBRÉGA et al., 2010).

Poucos são os estudos referentes à depleção da espermatogênese em peixes, sendo portanto, insuficiente para a padronização desta metodologia (BILLARD, 1982; LACERDA, 2006; 2010; MAJHI et al, 2009; NOBRÉGA et al., 2010; LACERDA et al., 2013; PACCHIARINI, 2014), pois pouco se conhece a respeito do tempo em que os animais permanecem com os testículos deplecionados após essas exposições (Busulfan e/ou a temperatura), bem como o tempo necessário de exposição a esses fatores, para obtenção da depleção por um longo período.

Considerando o exposto acima, este trabalho teve por objetivo, avaliar a eficiência dos tratamentos com Busulfan (Myleran) em conjunto com a temperatura de 30°C, para induzir a depleção das células germinativas em *Devario aequipinnatus*. Para que posteriormente essas informações possam ser utilizadas em futuros trabalhos de transplantes de espermatogônias, e possa garantir o sucesso no transplante e fixação das espermatogônias no receptor.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção dos animais

Espécimes adultos de *Devario aequipinnatus* (n=90), foram obtidos a partir de criadouros comerciais na região de Uberlândia, MG. Os animais foram acondicionados por um período de aproximadamente 30 dias em aquários com 60x35x40 cm de altura (64 litros), com sistema de filtragem, aeração constante, e temperatura controlada em 26°C. O fotoperíodo foi ajustado em 12:12. Os animais foram alimentados com ração comercial (Super Red 38% de proteína Bruta, 16% de Matéria mineral, 10% de umidade), três vezes ao dia.

Posteriormente a esse período os animais foram transferidos para um sistema de circulação de água, formado por três aquários de 30X15X20 cm de altura (9 litros), interligados, e com condições controladas, formando uma unidade experimental. Durante todo o experimento a temperatura foi mantida em 30°C (sendo elevado 1°C a cada dois dias, a partir da temperatura de 26°C), e monitorada com auxílio de Data loggers (Hobo UA-0002) com intervalo de 1 minuto entre as

medições. Com relação a alimentação dos exemplares, foi mantida a mesma da fase de adaptação.

Delineamento experimental

Foram utilizados 30 exemplares de *D. aequipinnatus* por unidade experimental (constituída de três aquários com 10 espécimes em cada). No T15/18, foram aplicadas duas injeções, via intracelomática, de 50 µl de solução contendo 49,9 µl de água destilada + Busulfan diluído em 0,1 µl de Dimetil Sulfoxido (DMSO), com intervalo de 10 dias entre as mesmas, sendo a primeira dose de 15 mg de Busulfan por Kilograma⁻¹ de peixe, e a segunda com 18 mg de Busulfan por Kg⁻¹ de peixe. Para o T40, foi aplicado somente uma injeção contendo 40 mg/kg⁻¹ de Busulfan, seguindo as mesmas proporções de diluição em água destilada e DMSO. As primeiras aplicações dos dois tratamentos ocorreram no mesmo dia (Tabela 1). Como grupo controle, foi utilizado uma unidade experimental com 30 animais, sem a inclusão de qualquer tipo de droga (Tabela 1), em que os animais permaneceram sob as mesmas condições de temperatura, alimentação e fotoperíodo, oferecidas para os animais utilizados dos tratamentos.

Foram coletados cinco indivíduos de cada tratamento de acordo com o Protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (11/2013/CEUA), iniciando-se no 5º dia após a primeira aplicação, e posteriormente com intervalos de três dias até o 17º dia. Os animais foram anestesiados em solução de 40 mg de óleo de cravo (eugenol) diluído em 1 ml de etanol por litro⁻¹ de água. Posteriormente cada exemplar teve seus dados biométricos aferidos (comprimento padrão, total e peso total), seus testículos foram removidos, pesados em balança de precisão (0,0001 g), e fixados em solução contendo 4% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão fosfato Sorensen a 0,2M, e pH 7,2 para posteriores análises histológicas.

Tabela 1. Período de coleta. **(T15/18)** 15 mg/Kg e 18 mg/Kg; **(T40)** 40 mg/kg

<u>Período de coleta após a 1ª aplicação</u>	1º dia	5º dia	8º dia	11º dia	14º dia	17º dia
Controle	-	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
T15/18	1º aplicação	n=5	n=5	n=5 2º aplicação	n=5	n=5
T40	1º aplicação	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5

Processamento para análise em microscopia de luz

Após a fixação do material coletado, os testículos dos espécimes de *D. aequipinnatus* foram fragmentados e processados segundo o protocolo a seguir: Após a remoção e fragmentação dos testículos, os mesmos permaneceram por um período mínimo de 24 horas em fixador (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de Sorensen, pH. 7,2). Em seguida, foram desidratados em série crescente de solução alcoólica embebidos em glicol metacrilato (Technovit 7100/historesina), posteriormente seccionados a 3,0 µm de espessura em micrótomo equipado com navalha de vidro LEICA RM 2245 e corados com Hematoxilina e Eosina. O fotoprocessamento foi realizado sob microscópio óptico Zeiss equipado com câmera AXIOCAM-MRc5. O processamento e a análise foram realizados no Laboratório de Ictiologia Neotropical, Departamento de Biologia e Zootecnia – UNESP/FEIS.

Análise Estereológica

Foi verificada a porcentagem de cada estrutura nos testículos de *D. aequipinnatus*. As estruturas consideradas foram: Espermatogônias, Espermátocitos, Espermátides, Espermatozoides, Interstício, Células de Sertoli, Células picnóticas e Lúmen tubular. Para esta análise foram utilizados cinco exemplares por tratamento em cada coleta. Após a confecção das lâminas histológicas, foram escolhidos aleatoriamente, dez campos de contagem, em aumento de 1000x, utilizando um retículo com 300 intersecções para cada campo por animal.

Picnose em células germinativas

A perda de células (picnose) foi quantitativamente avaliada e expressa como uma porcentagem de células picnóticas por 200 tipos de espermatogonias A e 1000 tipos de espermatogonias B, espermatócitos e espermátides. O valor obtido para cada animal foi utilizado para calcular a média dos índices picnóticos em cada tratamentos.

Forma de Análises dos Resultados

Foram realizadas análises comparativas entre os indivíduos (tratamentos e controle), para avaliação da depleção da espermatogênese. O experimento foi realizado totalmente ao acaso, contando com cinco repetições por tratamento. Aplicou-se aos dados o teste de homogeneidade de Bartlett e normalidade de Shapiro Wilk, utilizando posteriormente o teste de Kruskal Wallis com $\alpha = 0,05\%$. Os dados foram expressos pela média e erro padrão.

3.3 RESULTADOS

Durante o período experimental não ocorreu mortalidade dos animais em nenhum dos tratamentos analisados.

Análise Estereológica

O único tipo celular que apresentou diferença estatística foi o espermatócito (SPC), com uma redução na quantidade entre os tratamentos em todas as coletas (Fig.1). Outra alteração também foi verificada no Lúmen tubular, que aumentou ao longo das coletas 1, 3, 4 e 5 nos tratamentos (Fig.1). Com relação aos SPC observa-se uma redução entre os tratamentos em todas as coletas. Na coleta 1 a menor quantidade de SPC foi observada no T40 (Fig.2). Entretanto na coleta 2 verificou-se o menor valor de SPC observado durante todo o experimento no T40 (Fig.2). Na coleta 3 observa-se um aumento no número de SPC em todos os tratamentos, no entanto mantem-se o padrão observado nas coletas anteriores, onde o T40 apresentava os menores valores (Fig.2). A coleta 4 foi realizado 3 dias após a aplicação da 2ª dose do medicamento no T15/18 e observou-se uma redução mais acentuada de SPC neste tratamento (Fig.2). A quantidade de SPC observada no T40 na coleta 4 se manteve constante com a quantidade observada na coleta 3 (Fig.2). Na coleta 5 observa-se que os espécimes estão retornando a sua

espermatogênese normal, com o aumento na quantidade de SPC podendo ser observado tanto no T15/18 como no T40. O T15/18 apresenta a mesma quantidade de SPC observada no controle desta mesma coleta (Fig.2). Apesar do aumento de SPC observado no T40 esses valores são inferiores ao observado no T15/18 (Fig.2). A menor quantidade de SPC observado em todo experimento foi na coleta 2 no T40, com 8 dias após a aplicação do Busulfan (Fig.2).

Nota-se que no T40 o efeito do Busulfan foi mais prolongado atuando imediatamente sobre o testículo, acelerando o processo de redução de cistos (Fig.2).

Analisando os tratamentos histologicamente observa-se que no T15/18 o melhor resultado foi visualizado na coleta 4, provavelmente devido a aplicação da segunda dose do Busulfan (Fig.5 – K). E no T40 os melhores resultados foram observados nas coletas 3 e 4 (Fig.5 – I, L).

Com relação ao Lúmen na coleta 1 observa-se que a quantidade de lúmen tubular no T40 foi muito superior ao observado no T15/18, que também apresentou um aumento na quantidade de lúmen quando comparado ao controle, no entanto, esse aumento não foi tão acentuado (Fig.2). Este padrão também foi observado na coleta 3 com um aumento ainda mais significativo no T40 (Fig.2). Na coleta 4 apesar dos tratamentos apresentarem maior quantidade de lúmen quando comparado ao controle, esses valores apresentaram uma queda quando comparado a coleta anterior. E o T15/18 apresentou a maior quantidade de lúmen observada na coleta 4, provavelmente devido a 2ª aplicação do Busulfan feita 3 dias antes (Fig.2). Na coleta 5 observa-se que os valores de lúmen reduziram em todos os tratamentos quando comparado a coleta 4 e a maior quantidade de lúmen observada na coleta 5 foi no T40 (Fig.2). Observa - se que conforme a quantidade de SPC reduz entre os tratamentos a quantidade de lúmen aumenta (Fig.2).

Neste trabalho, apesar da diminuição de cistos de espermatócitos e do aumento do lúmen tubular encontrado entre os tratamentos a completa esterilização não foi observada em nenhuma das cinco coletas.

Picnose em células germinativas

Os únicos tipos celulares que apresentaram variação estatística quanto a quantidade de células picnóticas foram Espermatogônias A-ind (SPG A-ind) e Espermatogônias A-dif (SPG A-dif) (Fig.3).

Com relação as SPG A-ind, observa-se que a quantidade de picnose deste tipo celular foi observada com maior intensidade na coleta 1, onde não foram observadas nenhuma célula picnótica no controle e entre os tratamentos a maior quantidade de picnose foi visualizada no T40 (Fig.3). Na coleta 2 e 3 não houve variação no número de SPG A-ind em picnose entre os tratamentos. Na coleta 4 essa variação foi observada somente no T15/18, provavelmente devido a aplicação da 2ª dose de Busulfan (Fig.3). Observa-se que a variação de células picnóticas só foram identificadas nas coletas feitas após as aplicações (Fig.3).

Com relação as SPG A-dif observa-se uma variação na coleta 1 onde são encontradas maiores quantidades de SPG A-dif em picnose nos T15/18 e T40 não havendo variação entre eles. Na coleta 2 não foi observado variação significativa entre os tratamentos e o controle. Na coleta 3 os maiores valores de picnose foram observados no T40 não havendo diferença estatística entre o T15/18 e o controle. E nas coletas 4 e 5 também houve variação estatística.

Fases reprodutivas

Durante o experimento foram observadas todas as fases reprodutivas, as fases mais frequentes entre os indivíduos foram Maturação Final e Maturação Intermediária (Fig.4).

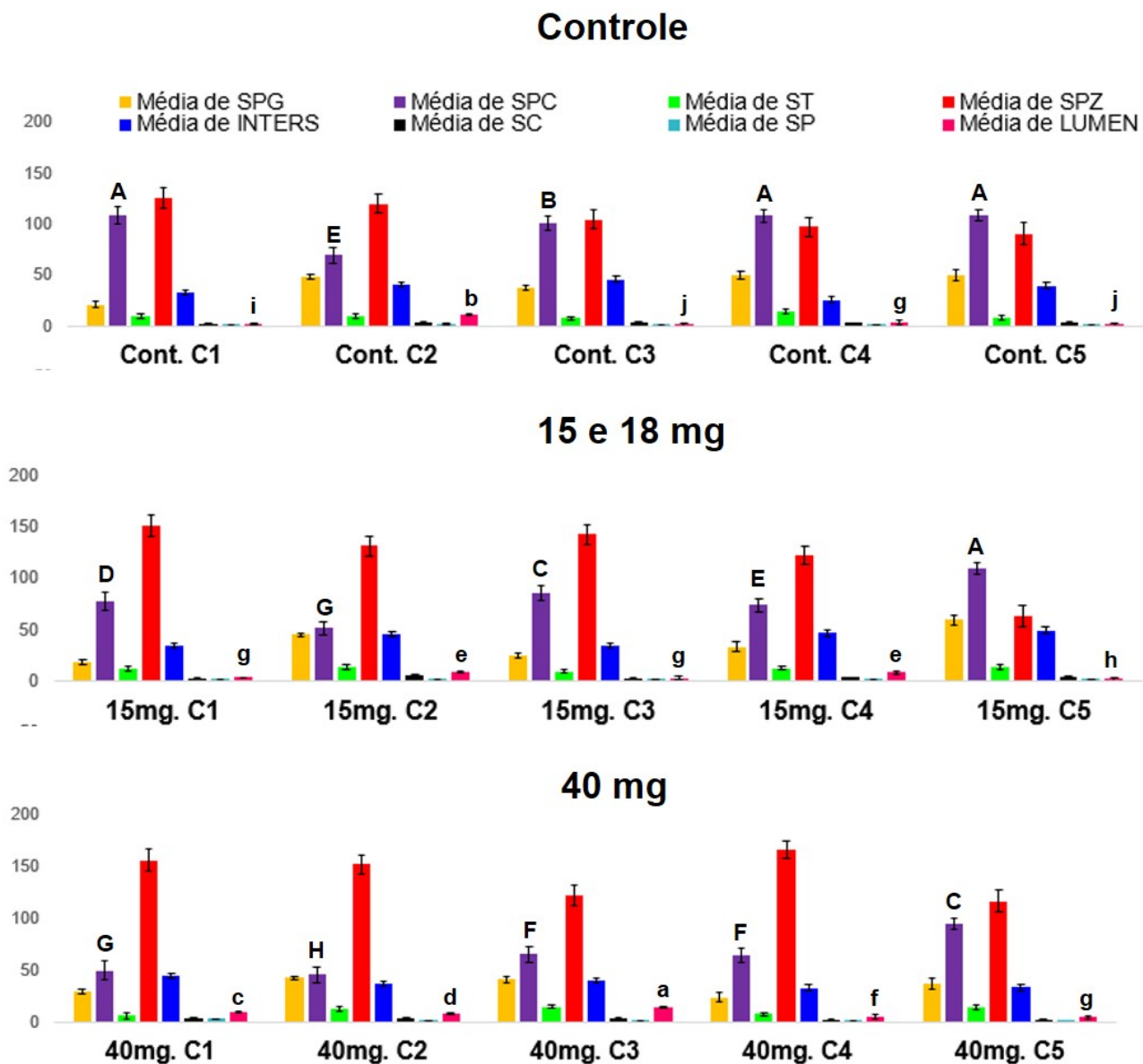
No T15/18 os melhores resultados podem ser observados pela presença de indivíduos em fase de maturação final nas coletas 2, 3 e 4 (Fig.4); sendo que na coleta dois, são observados pouquíssimos cistos germinativos nos testículos, na coleta 3 alguns cistos voltam a aparecer e na coleta 4 esses cistos estão ausentes (Figs.5 – E; H; K).

No T40 o efeito do Myleran foi mais prolongado, podendo ser observado em todas as coletas, nas coletas 2 e 4 todos os indivíduos coletados estavam em maturação final (Fig.4). Histologicamente os indivíduos apresentaram uma redução de cistos germinativos quando comparados ao controle desde a coleta 1, no entanto os melhores resultados foram observados nas coletas 2 a 5, principalmente na coleta 4 onde alguns indivíduos não apresentavam nenhum tipo celular além dos espermatozoides no lúmen tubular (Figs.5 – C, F, I, L, O). Na coleta 5 alguns cistos de células germinativas voltam a aparecer, no entanto a quantidade de cistos é inferior quando comparado ao controle e ao T15/18 (Figs.5 – M, N, O).

A fase de maturação final foi observada em todas as coletas, tanto dos tratamentos como do controle e, é caracterizada pela descontinuidade do epitélio germinativo testicular, porém houve uma variação na quantidade de cistos germinativos encontrado nesses indivíduos, sendo que nos indivíduos dos T15/18 e T40 a quantidade de cistos germinativos observados no epitélio germinativo foi inferior ao observado nos indivíduos que apresentaram a mesma fase reprodutiva no Controle (Fig.5). Alguns espécimes nos T15/18 e T40 não apresentaram nenhum cisto germinativo, apenas uma grande quantidade de espermatozoides no lúmen tubular (Fig.5).

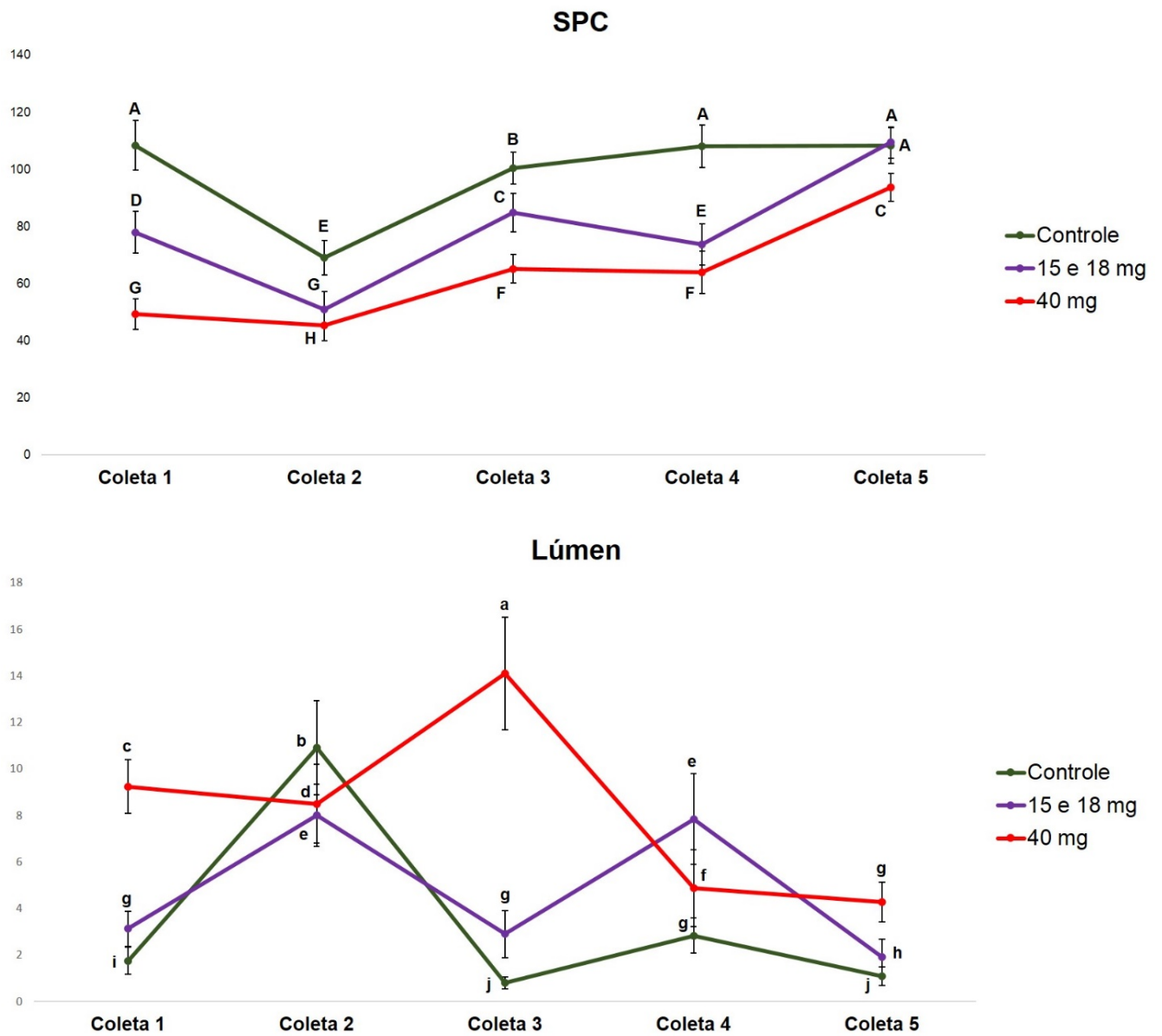
No controle mesmo com a temperatura elevada podemos observar que os indivíduos das coletas 4 e 5 já estão retornando a proliferação celular, dando sequência ao ciclo reprodutivo da espécie. No T15/18 esse retorno ao ciclo ocorre apenas na coleta 5. E no T40 o retorno dos indivíduos ao ciclo reprodutivo ainda não foi observado.

Figura 1. Análise quantitativa das células presentes nos túbulos seminíferos de *Devario aequipinnatus* durante as coletas por tratamentos. Abreviaturas: **SPG:** Espermatogônias; **SPC:** Espermatócitos; **ST:** Espermátides; **SPZ:** Espermatozoides; **INTERS:** Interstício; **SC:** Células de Sertoli; **CP:** Células Picnóticas; **LUMEN:** Lúmen; **Cont:** Controle; **C1:** Coleta 1; **C2:** Coleta 2; **C3:** Coleta 3; **C4:** Coleta 4; **C5:** Coleta 5. **15 e 18 mg:** T15/18; **40 mg:** T40. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes (Letras maiúsculas se referem aos SPC e letras minúsculas se referem ao Lúmen).



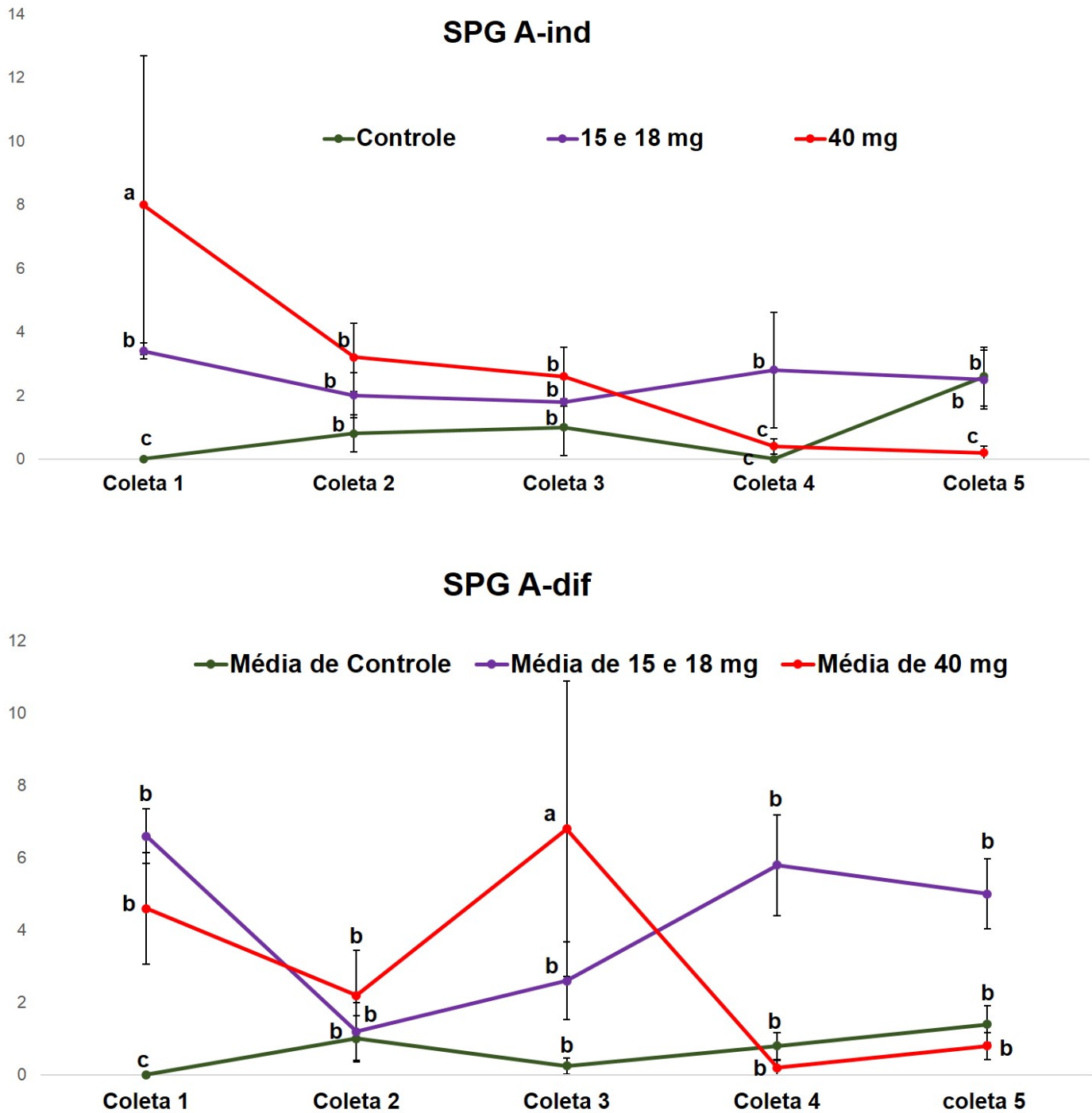
Fonte: própria autora

Figura 2. Média de Espermatoócitos (SPC) e Lúmen por tratamentos ao longo das coletas. **15 e 18 mg:** T15/18; **40 mg:** T40. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes (Letras maiúsculas se referem aos SPC e letras minúsculas se referem ao Lúmen).



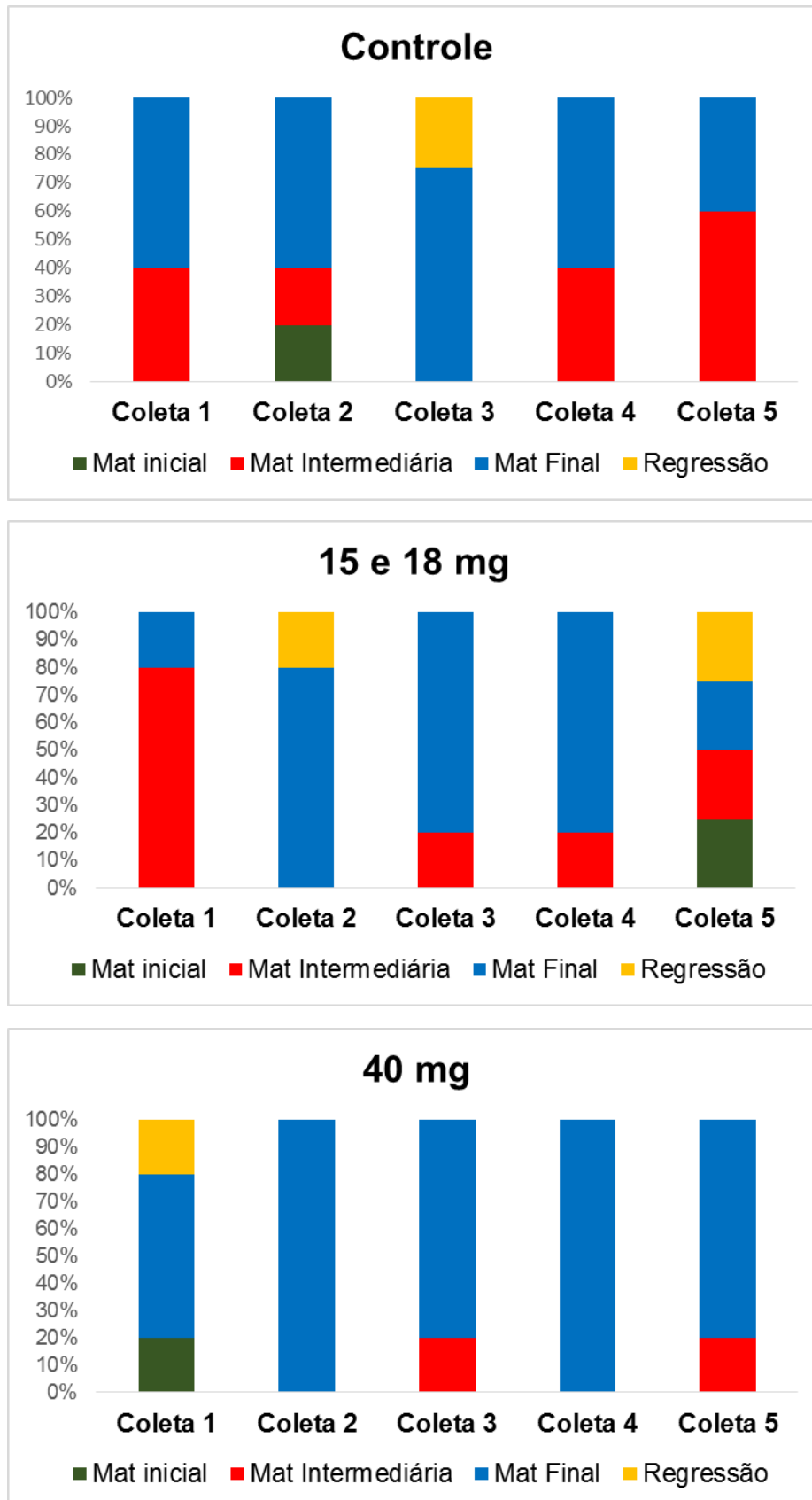
Fonte: própria autora

Figura 3. Pcnose em células germinativas. Os únicos tipos celulares que apresentaram variação estatística foram Espermatogônias A-ind (**SPG A-ind**) e Espermatogônias A-dif (**SPG A-dif**). **15 e 18 mg:** T15/18; **40 mg:** T40. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes.



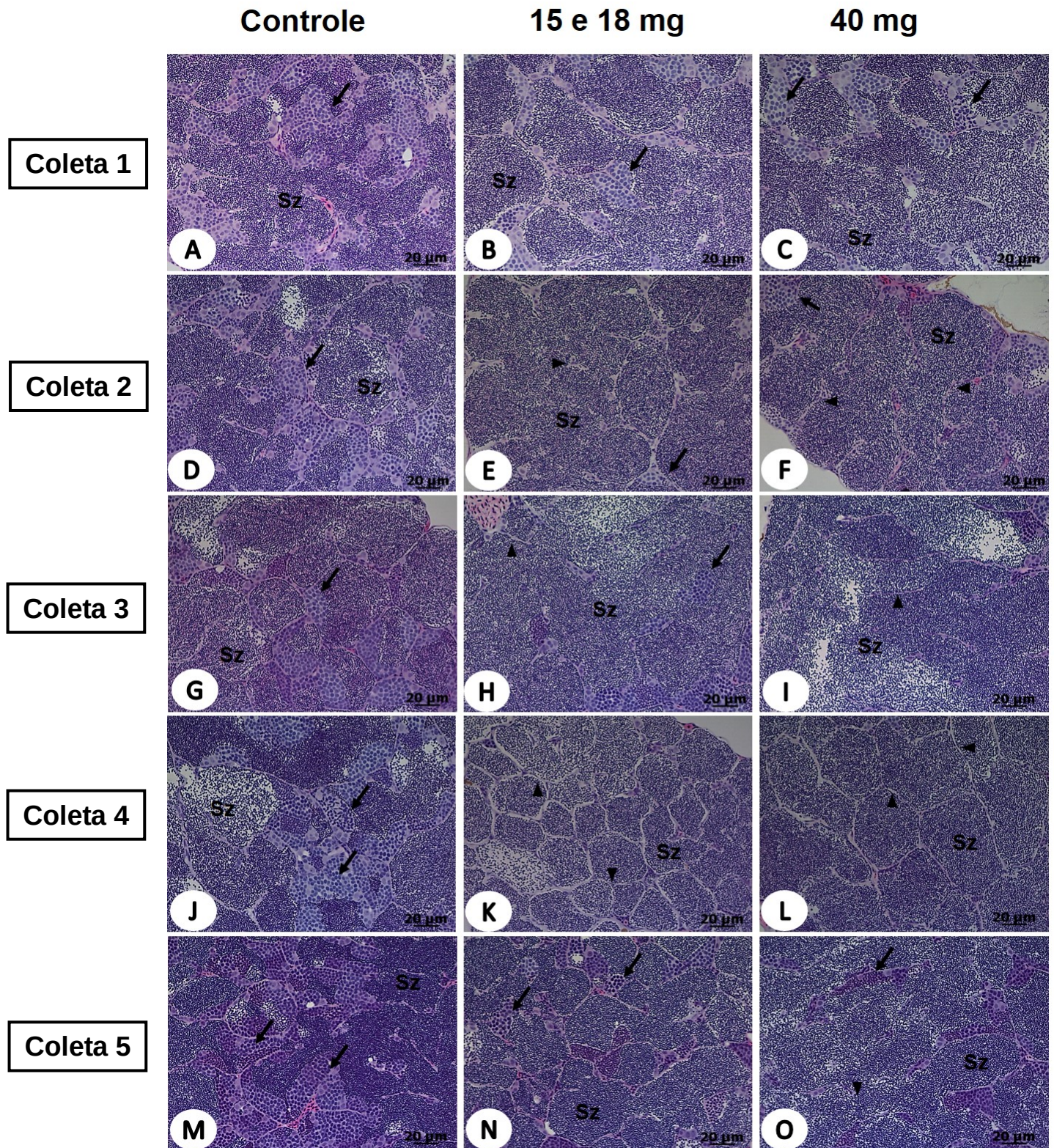
Fonte: própria autora

Figura 4 - Frequência de indivíduos de *Devario aequipinnatus* por fase reprodutiva, submetidos a temperatura de 30°C e Busulfan. **15 e 18 mg:** T15/18; **40 mg:** T40



Fonte: própria autora

Figura 5 – Espermatogênese em indivíduos de *Devario aequipinnatus* submetidos a temperatura de 30°C e Busulfan referente a fase de Maturação final em todos os tratamentos nas cinco coletas. **Seta:** Cistos germinativos; **Cabeça de seta:** Epitélio descontínuo sem a presença e cistos germinativos. **Sz:** Espermatozoide. **Coloração:** Hematoxilina/Eosina. **15 e 18 mg:** T15/18; **40 mg:** T40



3.4 DISCUSSÃO

Uma das dificuldades encontradas em trabalhos de depleção de células germinativas é com relação a mortalidade dos espécimes utilizados. Em peixes tanto em *Odontesthes hatcheri* (MAJHI et al., 2009; 2014), como na Truta Arco Íris (*Onchorynchus mykiss*) (BILLARD, 1982), foram relatadas mortalidades para as doses de Busulfan de 20-40 mg Kg⁻¹ e 10 mg Kg⁻¹. Pacchiarini, (2014), trabalhando com *Solea senegalensis*, observou alta taxa de mortalidade na dosagem de 80 mg Kg⁻¹, no entanto essa mortalidade não foi observada na dosagem de 40 mg Kg⁻¹, também ocorrido neste estudo, pois em ambos tratamentos (T15/18 e T40) não houve mortalidade de *D. aequipinatus*. Tal fato pode estar relacionado a resistência da espécie utilizada e a sua tolerância a esses compostos.

As gônadas dos animais receptores devem estar desprovidas de células germinativas, para que desta forma garanta o sucesso do transplante devido a disponibilidade e acessibilidade das espermatogônias-tronco implantadas (BRINSTER, 2002; BRINSTER et al., 2003). Neste trabalho o uso do quimioterápico Myleran (Busulfan) em conjunto com a temperatura de 30° se mostrou eficiente para esta finalidade, reduzindo a quantidade de cistos germinativos e atuando diretamente nas espermatogônias. No entanto a completa esterilização não foi observada em nenhuma das cinco coletas. Assim como o observado por Billard (1982), utilizando uma única dose de Busulfan e por Majhi et al., (2009) e Lacerda et al., (2006) com mais doses em associação com a alta temperatura, que também observaram uma diminuição considerável de cistos germinativos.

No T40 o efeito do Busulfan foi mais prolongado atingindo resultados mais satisfatórios na coleta 2 (8 dias após a aplicação do Busulfan) e na coleta 4 (14 dias após a aplicação do Busulfan). No T15/18 os melhores resultados observados na análise estereológica foi na coleta 2 com 8 dias após a aplicação da 1ª dose de Busulfan, no entanto histologicamente o melhor resultado foi observado na coleta 4 (3 dias após a aplicação da 2ª dose do Busulfan), esta melhoria na eliminação de células germinativas observadas nesta coleta provavelmente ocorreu devido a aplicação da dose reforço de 18 mg. A dosagem mais elevada de 40 mg teve um efeito imediato sobre os testículos, acelerando o processo de redução de cistos germinativos. Que no T15/18 ocorreu aos poucos se amplificando com a 2ª dose.

Os indivíduos observados por Majhi et al., (2009) apresentaram ulcerações e células picnóticas, levando a mortalidade de alguns indivíduos, principalmente em

fêmeas. Apesar de neste trabalho não ter sido constatado mortalidade nos indivíduos, observou-se altos índices de picnose nos seguintes tipos celulares: SPG A-ind e SPG A-dif. Este fato pode estar relacionado a forma de ação do Busulfan, que atua diretamente sobre as células com alto índice de proliferação, como é o caso das espermatogônias (BRINSTER et al., 2003; HONARAMOOZ et al., 2005). Esses índices picnóticos foram observados com maior intensidade 3 dias após a aplicação do medicamento tanto na dose única, como na dose dupla evidenciando o fato de que a morte celular ocorre como resultado de um efeito imediato causado pelo Busulfan.

A fase reprodutiva mais frequente durante o experimento foi maturação final, que foi observada em todos os tratamentos, sendo caracterizada pela presença de um epitélio descontínuo ao longo do testículo por um longo período de tempo. Mesmo com a influência da temperatura no controle e no T15/18 a espermatogênese prossegue com o ciclo reprodutivo, que neste grupo de peixes é bem acelerada (NOBRÉGA et al., 2010). Comprovando que o Busulfan atrasa o ciclo reprodutivo, diminuindo a espermatogênese principalmente na dosagem mais elevada.

A quantidade de cistos observados nos indivíduos classificados como maturação final variou entre os tratamentos com uma redução de cistos nos indivíduos tratados com Busulfan. Em trabalhos anteriores os autores afirmam que houve redução de cistos, no entanto não apresentam esses resultados histologicamente (BILLARD, 1982; MAJHI et al., (2009; 2014); LACERDA et al., 2006) demonstrando em qual fase de desenvolvimento testicular os indivíduos se encontram.

O tratamento que se mostrou mais eficiente foi o T40 com a dosagem única e mais elevada, onde inibiu a espermatogênese por um tempo mais prolongado quando comparado a dosagem inferior.

3.6 CONCLUSÃO

Deste modo podemos concluir que o Busulfan influencia no desenvolvimento testicular de *D. aequipinnatus*, acelerando a espermatogênese e inibindo o retorno ao ciclo reprodutivo, principalmente na dosagem mais elevada (fig. 4).

REFERÊNCIAS

- ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1, p. 205–228, 2001.
- BILLARD, R. Attempts to inhibit testicular growth in rainbow trout with Antiandrogens (Cyproterone, Cyproterone Acetate, Oxymetholone) and Busulfan given during the period of spermatogenesis. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 48, n. 1, p. 33-38, 1982.
- BRINSTER R. L. Germline stem cell transplantation and transgenesis. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2174–2176, 2002.
- BRINSTER C. J.; RYN B. Y.; AVARBOCK, M. R.; KARAGENC, L.; BRINSTER R. L.; Restoration of fertility by germ cell transplantation requires efficient recipient preparation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, n. 2, p. 412-420, 2003.
- BRINSTER R. L.; ZIMMERMANN J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Biological Sciences**, Washington, v. 91, n. 24, p. 11298-11302, 1994.
- BRINSTER, R. L.; AVARBOCK M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Biological Sciences**, Washington, v. 91, n. 24, p. 11303-11307, 1994.
- BYERLY, M. T.; FAT-HALLA, S. L.; BETSILL, R. K; PATIN, R. Evaluation of short-term exposure to high temperature as a tool to suppress the reproductive development of channel catfish for aquaculture. **North American journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 67, n. 4, p. 331–339, 2005.
- HERMANN, B. P.; SUKHWANI, M.; LIN, C.; SHENG, Y.; TOMKO, J. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult Rhesus macaques. **Stem Cells**, Lansing, v. 25, n. 9, p. 2330–2338, 2007.
- KAPUSCINSKI, A. R.; PATRONSKI, T. J. **Genetic methods for biological control of non-native fish in the Gila River Basin**. Contract report to the U.S. Fish and Wildlife Service. University of Minnesota, Institute for Social, Economic and Ecological Sustainability, St. Paul, Minnesota. Minnesota Sea Grant Publication F, v. 20, 2005.
- KIM, Y.; SELVARA, J. V.; DOBRINSKI, I.; LEE, H.; MCENTEE M. C.; TRAVIS, A. J. Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 27, n. 2, p. 248-256, 2005.

LACERDA, S. M. S. N. **Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental.** 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. Disponível em: <
http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ICBC-6W6HT2/disserta__o_samyra_nassif.pdf?sequence=1>. Acesso em: 15 abr. 2013.

LACERDA, S. M. S. N. **Transplante Singênico e Xenogênico de espermatogônias-tronco em tilápias-nilóticas (*Oreochromis niloticus*) adultas.** 2010. 102 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; PEIXOTO, M. T. D.; RESENDE, R. R.; FRANÇA, L. R. Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. **General and comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v. 192, p. 95-106, 2013.

MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; RAHMAN, S. M.; STRUSSMANN, C. A. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. **Plosone**, v. 9, n. 4, e95294, 2014. Disponível em: <
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0095294>>. Acesso em: 20 out. 2014.

MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; RAHMAN, S. K. M.; SUZUKI, T.; STRUSSMANN, C. A. Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, n. 7, p. 1162–1172, 2009.

MOLENAAR, R.; DE ROOIJ, D. G.; ROMMERTS, F. F.; REUVERS, P. J.; VAN DER MOLEN, H. J. Specific destruction of Leydig cells in mature rats after in vivo administration of ethane dimethyl sulfonate. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 33, n. 5, p. 1213-1222, 1985.

NÓBREGA R. H.; GREEBE C. D.; KANT, H. V.; BOGERD J.; FRANCA L. R.; SCHULZ R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **Plosone**, v. 5, n. 9, 2010. Disponível em: <
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0012808>>. Acesso em: 20 out. 2014.

OGAWA, T. ;DOBRINSKI, I.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. **Biology and Reproduction**, Champaign, v. 60, n. 2, p. 515-521, 1999.

OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; KANNO, M.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, Washington, v. 317, n. 5844, p. 1517-1517, 2007.

PACCHIARINI, T.; OLAGUE, E.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Busulfan administration produces sublethal effects on somatic tissues and inhibits

gametogenesis in Senegalese sole juveniles. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 29, n. 5, p. 619-628, 2014.

SHINOHARA, T.; ORWIG, K. E.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Restoration of Spermatogenesis in Infertile Mice by Sertoli Cell Transplantation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 3, p.1064–1071, 2002.

STRUSSMANN C.A.; SAITO T.; TAKASHIMA F. Heat induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Philadelphia, v. 119, n. 2, p. 637–644, 1998.

VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P. ; FRANÇA L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 28, n. 1-4, p. 187–190, 2003.

YOSHIZAKI G.; FUJINUMA K.; IWASAKI Y.; OKUTSU T.; SHIKINA S.; YAZAWA R.; TAKEUCHI Y. Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D: Genomics and Proteomics**, v. 6, n.1, p. 56-61. 2011.