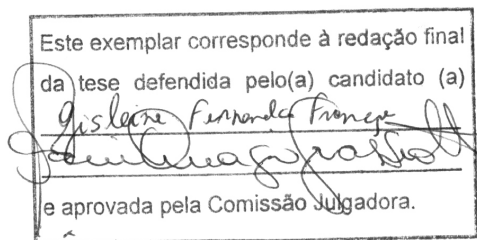


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Gisleine Fernanda França

**Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de
representantes da ordem Gymnotiformes (Teleostei, Ostariophysi)
com considerações filogenéticas.**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Irani Quagio Grassiotto

Campinas, 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F844u **França, Gisleine Fernanda**
Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de representantes da ordem Gymnotiformes (Teleostei, Ostariophysi) com considerações genéticas / Gisleine Fernanda França. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Irani Quagio-Grassiotto.

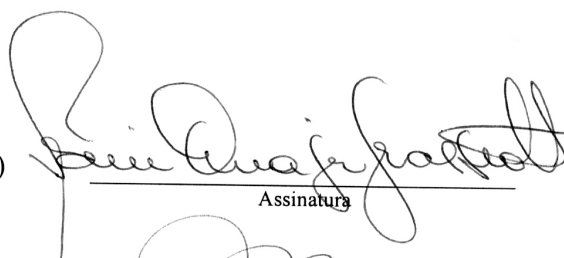
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Gymnotiformes. 2. Ultraestrutura (Biologia). 3. Filogenia.
I. Quagio-Grassiotto, Irani. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 10 de março de 2006.

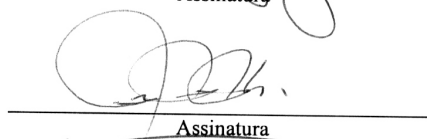
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Irani Quagio Grassiotto (Orientadora)



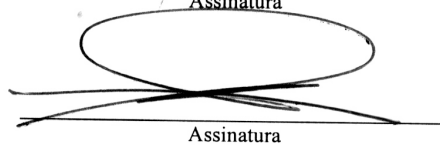
Assinatura

Prof. Dr. José Lino Neto



Assinatura

Prof. Dr. Mauro Luís Triques



Assinatura

Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

Assinatura

Profa. Dra. Karina Carvalho Mancini

Assinatura

"Ensinar é aprender duas vezes"
Joseph Joubert

Meus agradecimentos

- À Prof.^a Dr.^a Irani Quagio-Grassiotto pela orientação, amizade, ajuda e pelos ensinamentos em todos estes anos de trabalho;
- Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira pela atenção, dedicação, ajuda, amizade e pelos ensinamentos;
- À Prof.^a Dr.^a Karina Carvalho Mancini, ao Prof. Dr. Odair Aguiar Júnior e ao Prof. Dr. Ricardo Campos-da-Paz, pela disponibilidade e contribuições dadas a este trabalho no decorrer da banca prévia;
- Ao Prof. Dr. Ricardo Campos-da-Paz pelas identificações dos espécimes;
- Aos membros da Banca Examinadora pela disponibilidade e por ter aceitado fazer parte da banca de defesa;
- Ao Departamento de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu pela acolhida nos últimos cinco anos e pelo uso das instalações para o desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Departamento de Biologia Celular, I.B., UNICAMP pela oportunidade de realização da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural;
- Aos técnicos do Laboratório de Rotina em Biologia Celular e de Reprodução de Peixes Neotropicais, Depto. de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, Antônio Vicente Salvador e Ricardo André dos Santos Teixeira, pela colaboração no processamento do material e nas coletas;
- Ao Centro de Microscopia Eletrônica, I.B., UNESP, Botucatu e à sua supervisora Prof.^a Dr.^a Elisa Aparecida Gregório, pela utilização das instalações;
- Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica, I.B., UNESP, Botucatu, Claudete dos Santos Tardivo, Maria Euleda Lino Peres, Maria Helena Moreno e Nivalde Antônio Basso, pela amizade e grande auxílio técnico prestados no decorrer deste trabalho;

- À Líliam Alves Senne Panagio, secretária do Depto. de Biologia Celular, I.B., UNICAMP, pela imensa ajuda e amizade;
- À Luciana Cristina Montes, secretária do Depto. de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, pela amizade e colaboração;
- Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução de Peixes Neotropicais, I.B., UNESP, Botucatu, Angélica, Ariene, Fernanda, João Paulo, Márcio, Rafael, Rinaldo e Rosicleire, pela ajuda e conversas;
- Aos companheiros de coleta do Laboratório de Genética e Citogenética de Peixes Manuel e Ricardo, pela ajuda e diversão nas coletas, ohh Glória!
- Aos amigos do Laboratório de Ecologia de Peixes, Ana Paula, Igor, Jaciara, José Luis e Marina, pelas conversas e momentos de descontração na sala de estagiários;
- As minhas amigas do Laboratório de Biologia da Reprodução, Arielle, Carla, Elaine e Glaura, pela amizade;
- Ao meu namorado Newton pelo amor, carinho, atenção, compreensão e ajuda. Obrigada por sempre me incentivar e querer o melhor para mim;
- À minha família e especialmente à minha mãe, Sueli, e minha irmã Gisela, pelo carinho, ajuda e incentivo constante;
- Aos meus sobrinhos Luis Guilherme, Maria Eduarda e Vinícius, pelo carinho e diversões nas horas de lazer;
- As minhas amigas Ana Luísa (Tsé²), Gisela (Crotalária) e Raquel (Grozéia) pela amizade e companheirismo.
- Ao Roberto, meu amigo por “osmose”, pelos momentos de grande descontração;
- À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
1.1. Superordem Ostariophysi	4
1.2. Ordem Gymnotiformes	6
1.3. Espermiogênese e ultraestrutura dos espermatozóides	8
2. Objetivos	16
3. Capítulos (artigos)	
3.1. Capítulo I	17
3.2. Capítulo II	41
3.3. Capítulo III	64
4. Considerações Finais	80
5. Referências Bibliográficas	83

Resumo

Os peixes da ordem Gymnotiformes formam um grupo monofilético, dentre outras apomorfias, por compartilharem características como a detecção e emissão de campo elétrico, corpo em forma de cutelo e presença de nadadeira anal muito alongada. Inclui atualmente cinco famílias: Gymnotidae, Hypopomidae, Rhamphichthyidae, Sternopygidae e Aptereronotidae. As hipóteses atuais sobre as relações entre as famílias de Gymnotiformes são baseadas em caracteres morfológicos, osteológicos, moleculares e fisiológicos. Vários estudos têm revelado que os caracteres ultraestruturais dos espermatozóides, bem como da espermiogênese em teleósteos, apresentam importantes implicações filogenéticas. Foi estudada a ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides, e 31 caracteres foram extraídos e utilizados na análise filogenética. Para tanto foram utilizados representantes das famílias Gymnotidae (*Gymnotus cf. anguillaris*), Hypopomidae (*Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus*), Rhamphichthyidae (*Rhamphichthys cf. hahni*), Aptereronotidae (*Aptereronotus cf. albifrons*) e Sternopygidae (*Eigenmannia cf. virescens* (1) e *Eigenmannia cf. virescens* (2)). Os dados obtidos foram utilizados para obtenção de uma matriz de caracteres, utilizada na elaboração de hipóteses filogenéticas de relacionamento entre as espécies estudadas. As análises filogenéticas, conduzidas com este conjunto de dados, mostram algumas semelhanças e incongruências com hipóteses já propostas na literatura. É discutida a importância das características da espermiogênese e do espermatozóide no estudo das relações entre famílias de Gymnotiformes.

Abstract

Fishes of the order Gymnotiformes compose a monophyletic group, among other characteristics, by the production and detection of electric fields. They have a knife-like appearance and an elongate anal fin. The order includes five families: Gymnotidae, Hypopomidae, Rhamphichthyidae, Sternopygidae, and Aptereronotidae. Recent hypothesis about the relationships among the families of Gymnotiformes were established based on morphological, molecular, and physiological data. Several studies have suggested that the spermatozoa ultrastructure characters and spermiogenesis in the Teleostei have significant phylogenetic implications. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure were study, and Thirty-one characters was extract and usage in the analysis phylogenetic. For this purpose, representatives of each Gymnotiformes family were utilized: Gymnotidae (*Gymnotus cf. anguillaris*), Hypopomidae (*Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus*), Rhamphichthyidae (*Rhamphichthys cf. hahni*), Aptereronotidae (*Aptereronotus cf. albifrons*) e Sternopygidae (*Eigenmannia cf. virescens* (1) and *Eigenmannia cf. virescens* (2)). The data obtained were employed in the construction of a character matrix, used in the elaboration of a phylogenetic hypothesis of the relationships among the species. Phylogenetic analysis conducted with these data, resulted in some similarities and some dissimilarities regarding to the currently accepted hypothesis of relationship among Gymnotiformes. The importance of spermiogenesis and spermatozoa characteristics in the study of relationship among families of Gymnotiformes is discussed.

1. Introdução

A sistemática filogenética, estudo das relações evolutivas entre os organismos, é a área da Biologia para a qual convergem todas as demais áreas. Considerando que a história evolutiva dos organismos está associada às mudanças climáticas e geográficas ocorridas durante a história do planeta, a elucidação das relações filogenéticas entre os organismos, além de permitir o estudo da sua evolução, também é base para estudos biogeográficos e ecológicos (Futuyma, 1992). O conhecimento acerca da diversidade biológica é o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida e o reconhecimento de espécies, bem como a habilidade de nomeá-las. Ainda, é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e todas as outras disciplinas relacionadas aos organismos (Savage, 1995).

A fauna de peixes neotropicais de água doce é bastante diversificada, sendo conhecidas 71 famílias, 4.475 espécies consideradas válidas e outras cerca de 1.600 ainda não descritas (Reis *et al.*, 2003). Schaefer (1998) estimou que podiam existir cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais o que corresponderia a 25% de todas as espécies de peixes do mundo. Esse número é aceito por Vari e Malabarba (1998) que acrescentam que toda essa diversidade de peixes de água doce neotropicais ocorre em menos de 0,003 % da água doce do planeta. Estudos sistemáticos de peixes neotropicais, baseados em dados morfológicos, têm-se expandido consideravelmente nos últimos anos (ver referências em Malabarba *et al.*, 1998), principalmente após a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados, entre as quais está o uso de análise filogenética, proposta por Hennig (1966) e implementada por diversos autores. Apesar dos

notáveis progressos, muito ainda resta a ser conhecido sobre a filogenia dos diversos grupos de peixes, devido à imensa magnitude da biodiversidade neotropical.

1.1. Superordem Ostariophysi

A superordem Ostariophysi compreende cerca de três quartos dos peixes de água doce do mundo e é o grupo dominante na ictiofauna neotropical. Essa superordem está incluída na divisão Teleostei, subdivisão Euteleostei (Lauder & Liem, 1983). A superordem é atualmente constituída pelas ordens: Gonorynchiformes, Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes. As relações de parentesco entre as ordens que compõem os Ostariophysi são ainda controversas. Regan (cf. 1911 a, b *apud* Dimmick & Larson, 1996) reconheceu os Siluroidei como grupo irmão de todos os outros Otophysi e Cypriniformes como grupo irmão do clado contendo os Characiformes e os Gymnotoidei. Rosen & Greenwood (1970) dividiram a superordem Ostariophysi em duas unidades, com base na presença do aparelho de Weber, nos Otophysi (Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes) e sua ausência, nos Anotophysi (Gonorynchiformes). Os Gonorynchiformes foram considerados grupo irmão dos Otophysi (Rosen & Greenwood, 1970). O aparelho de Weber consiste de um complexo formado por um conjunto de ossículos independentes (*tripus*, *intercalarium*, *clastrum* e *scaphium*) que permite a conexão da bexiga natatória com o ouvido interno. Roberts (1973) revisou 22 caracteres morfológicos dos Otophysi e não encontrou evidências de que os Cypriniformes e os Characiformes estejam mais relacionados entre si do que com os Siluroidei, e considerou os Characiformes como o grupo irmão dos Gymnotoidei. Fink & Fink (1981) testaram a

hipótese de Roberts (1973) numa análise cladística utilizando 127 caracteres morfológicos, que aceitou os Cypriniformes como grupo irmão de todos os outros Otophysi e os Siluroidei como grupo irmão dos Gymnotoidei. Neste mesmo trabalho os Otophysi foram reordenados em: Cypriniphysi, incluindo a ordem Cypriniformes (carpas, barbos); Characiphysi, incluindo Characiformes (lambaris, piranhas, pacus), Gymnotiformes (poraquês, tuiuiús, morenitas) e Siluriformes (peixes de couro, cascudos) (**Fig. 1**). Em trabalho posterior Fink e Fink (1996) aloca Gymnotiformes e Siluriformes em Siluriphysi. Dezesesseis características listadas no mesmo trabalho, parte delas referentes à anatomia neural do sistema eletro-sensorial, sustentam o monofiletismo do clado formado por Gymnotiformes e Siluriformes.

Numa análise cladística combinada de dados morfológicos e moleculares, Dimmick & Larson (1996) apontam os Gymnotoidei como mais relacionado com os Siluroidei, e o clado formado por ambos, como grupo irmão dos Characiformes, suportando a filogenia proposta por Fink & Fink (1981, 1996). No entanto quando os autores separaram os dados e analisaram somente os dados moleculares os Gymnotiformes surgem como grupo irmão dos Characiformes, e o clado formado por ambos como grupo irmão dos Siluriformes. Ortí (1997), também trabalhando com dados moleculares, encontrou os Gymnotiformes mais relacionados com os Characiformes do que com Siluriformes, corroborando o resultado obtido por Dimmick & Larson (1996) a partir do mesmo tipo de dado. Recentemente Lavoué *et al.* (2005), com base em dados moleculares do genoma mitocondrial completo, aceitam os Siluriformes e os Characiformes como grupos irmãos e, as duas ordens juntas, como grupo irmão dos Gymnotiformes (**Fig. 2**).

1.2. Ordem Gymnotiformes

Os Gymnotiformes são um componente importante da ictiofauna de água doce das Américas Central e do Sul. São encontrados através do trópico úmido em quase todos os tipos de biótipos presentes nos rios desde o sul do México até o norte da Argentina (Mago-Leccia, 1994). Todos os Gymnotiformes vivos ou fósseis estão restritos às águas doces Neotropicais, sendo a bacia amazônica a área de maior diversidade. Compreendem cerca de 135 espécies válidas descritas, que se encontram distribuídas em 32 gêneros e 5 famílias. Porém, acredita-se que o número atual de Gymnotiformes é provavelmente algo entre 200 a 300 espécies (Albert & Crampton, 2005). Estas espécies formam um clado monofilético, caracterizado entre outras apomorfias, pela capacidade de produzir e detectar campos elétricos de diferentes intensidades. Os órgãos elétricos estão presentes em todas as espécies conhecidas e em diferentes graus de desenvolvimento. Além disso, estes peixes são relativamente pouco variáveis em termos de morfologia externa, têm o corpo muito alongado, em forma de faca ou cutelo, não possuem cintura pélvica e nadadeiras pélvicas, e nem as nadadeiras dorsais. A nadadeira anal, muito longa, medial e ondulante, é responsável pelo seu movimento na água. Têm o corpo coberto por escamas ciclóides delgadas, as quais podem estar ausentes na região dorso anterior ou estar restritas somente à cauda (Mago-Leccia, 1994; Albert & Campos-da-Paz, 1998; Campos-da-Paz & Albert, 1998; Albert, 2001).

Apesar das relações evolutivas dos Gymnotiformes estarem sustentadas por caracteres moleculares e morfológicos, as principais hipóteses de relações dentro da ordem ainda se encontram em debate. Triques (1993) e Gayet *et al.* (1994), trabalhando com dados

morfológicos, reconheceram a família Apterontidae como o gymnotiforme mais basal, por considerarem a presença da nadadeira caudal um caráter primitivo. Mago-Leccia (1994), também com base em dados morfológicos, separa a ordem em duas subordens: Sternopygoidei, constituída pelas famílias Sternopygidae e Apterontidae, e Gymnotoidei, com as famílias Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Gymnotidae e Electrophoridae. Alves-Gomes *et al.* (1995) apresentaram a primeira análise de dados moleculares para a ordem, utilizando dados de 19 táxons de Gymnotiformes. A partir da análise combinada de dados moleculares e do sistema eletromotor, concluíram que a família Sternopygidae não forma um grupo natural, sendo o gênero *Sternopygus* deslocado para a posição mais basal do grupo, como grupo irmão de todos os outros Gymnotiformes. Neste mesmo trabalho a família Hypopomidae foi tida como não monofilética, e a ordem sofreu uma reestruturação, sendo dividida em cinco clados naturais: família Sternopygidae; famílias Electrophoridae e Gymnotidae; famílias Hypopomidae e Rhamphichthyidae; um novo clado formado pelos Sternopygidae remanescentes – família Eigenmanniidae; e família Apterontidae. Já para Albert & Campos-da-Paz (1998), Albert (2001), Albert & Crampton (2005), os gêneros *Gymnotus* e *Electrophorus* formam um grupo natural (família Gymnotidae), que corresponde ao grupo irmão dos demais Gymnotiformes, referidos como Sternopygoidei. Rhamphichthyidae e Hypopomidae constituem a superfamília Rhamphichthyoidea enquanto Sternopygidae e Apterontidae formam a superfamília Sinusoidea (**Fig. 3**). Parecendo ser *Sternopygus astrabes* o mais próximo do fenótipo ancestral da ordem, por conter muitas condições plesiomórficas, algumas como corpo moderadamente comprimido lateralmente, e 18 a 20 vértebras na cavidade celômica (Albert & Campos-da-Paz, 1998).

1.3. Espermiogênese e ultraestrutura dos espermatozóides

Além dos dados somáticos tradicionais e moleculares, um novo conjunto de caracteres – a ultraestrutura dos espermatozóides - tem chamado a atenção por sua aplicabilidade potencial nas análises filogenéticas (Baccetti *et al.*, 1984; Jamieson 1991; Mattei, 1991; Burns *et al.*, 1998).

Tendo por base a estrutura, organização celular e o tipo de fertilização, os gametas masculinos são classificados em basais ou modificados. Entende-se por primitivos os espermatozóides dos animais com fertilização externa liberados no meio aquático. Estes apresentam, numa sequência ântero-posterior: acrossoma; núcleo esférico; dois centríolos, sendo que o distal se diferencia em corpúsculo basal e dá origem ao axonema; mitocôndrias arredondadas e pouco numerosas e flagelo contendo apenas o axonema clássico do tipo 9 + 2 (Franzén, 1970). Os espermatozóides dos peixes têm sido considerados como do tipo primitivo. No entanto, os estudos de Jamieson (1991) e Mattei (1991) apontam para o equívoco desta classificação e mostram que a diversidade de formas apresentadas por estes espermatozóides é imensa. Além disso, os espermatozóides tidos como primitivos estão presentes em grupos de peixes “superiores”, enquanto grupos “inferiores” apresentam espermatozóides estruturalmente considerados avançados. Ambos os autores mostram também que entre os Pisces, os espermatozóides do tipo primitivo são encontrados apenas entre os Neopterygii, grupo derivado dentro de Teleostei (Lauder & Liem, 1983), onde constituem a forma dominante.

Segundo Jamieson (1991), os espermatozóides dos Neopterygii podem ter se desenvolvido secundariamente a partir de formas mais complexas. Além disso, neste grupo

de peixes os espermatozóides não possuem acrossoma. Esta ausência vem acompanhada da presença da micrópila nos óvulos destes animais (Jamieson, 1991). A micrópila é uma abertura no envoltório do óvulo que permite a passagem do espermatozóide no momento da fertilização (Amanze & Yvengar, 1990).

Conforme Mattei (1970), nos espermatozóides dos peixes, o eixo flagelar pode posicionar-se paralela ou perpendicularmente ao núcleo. Estas posições resultam da ocorrência ou não da rotação nuclear e caracterizam dois tipos de espermiogênese, tipo I (**Fig. 4**) e II (**Fig. 5**), respectivamente.

Em espécies de uma mesma família, a estrutura dos espermatozóides é pouco variada (Baccetti *et al.*, 1984; Jamieson, 1991; Mattei, 1991), tornando sua caracterização bastante útil na identificação de padrões de relacionamento interfamiliar. Jamieson (1991) resume o conhecimento a respeito da estrutura dos espermatozóides para os diversos grupos de peixes, assinalando as modificações estruturais que ocorreram em cada linhagem. Atualmente vários grupos são suportados com base na estrutura de seus espermatozóides. Por exemplo, o monofiletismo da superordem Elopomorpha é corroborada por cinco sinapomorfias derivadas da estrutura dos espermatozóides (Jamieson, 1991).

A despeito dos estudos de Jamieson (1991) e Mattei (1988, 1991) fornecerem dados da ultraestrutura dos espermatozóides de praticamente todos os grandes grupos de peixes vivos, os espermatozóides dos Ostariophysi neotropicais de água doce, considerada a sua diversidade e o grande número de espécies existentes, ainda são pouco conhecidos. Vários estudos têm apresentado dados gerais sobre os espermatozóides dos Characiformes (Matos *et al.*, 1993, 1998, 2000; Magalhães, 1998; Romagosa *et al.*, 1999; Aires *et al.*, 2000; Zaiden, 2000; Andrade *et al.*, 2001) e dos Siluriformes neotropicais (Santos *et al.*,

2001), sendo, no entanto, pouco aqueles que fornecem uma descrição mais detalhada destas células seja para os Characiformes (Burns *et al.*, 1998; Pecio & Rafinski, 1999; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001a; Gusmão-Pompiani, 2003; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003; Veríssimo-Silveira, 2003) ou para os Siluriformes (Burns *et al.* 1998; Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001b; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2005).

Quanto aos Gymnotiformes, até o momento o único espermatozóide que se encontra documentado é o do Apterodontidae *Apterodontus albifrons* (= *Sternarchus albifrons*) (Jamieson, 1991).

Considerando o exposto, tem-se que os estudos da espermiogênese e da ultraestrutura dos espermatozoides podem ser bastante úteis no estudo das relações entre os componentes da ordem Gymnotiformes, e também da relação com as demais ordens de Ostariophysi.

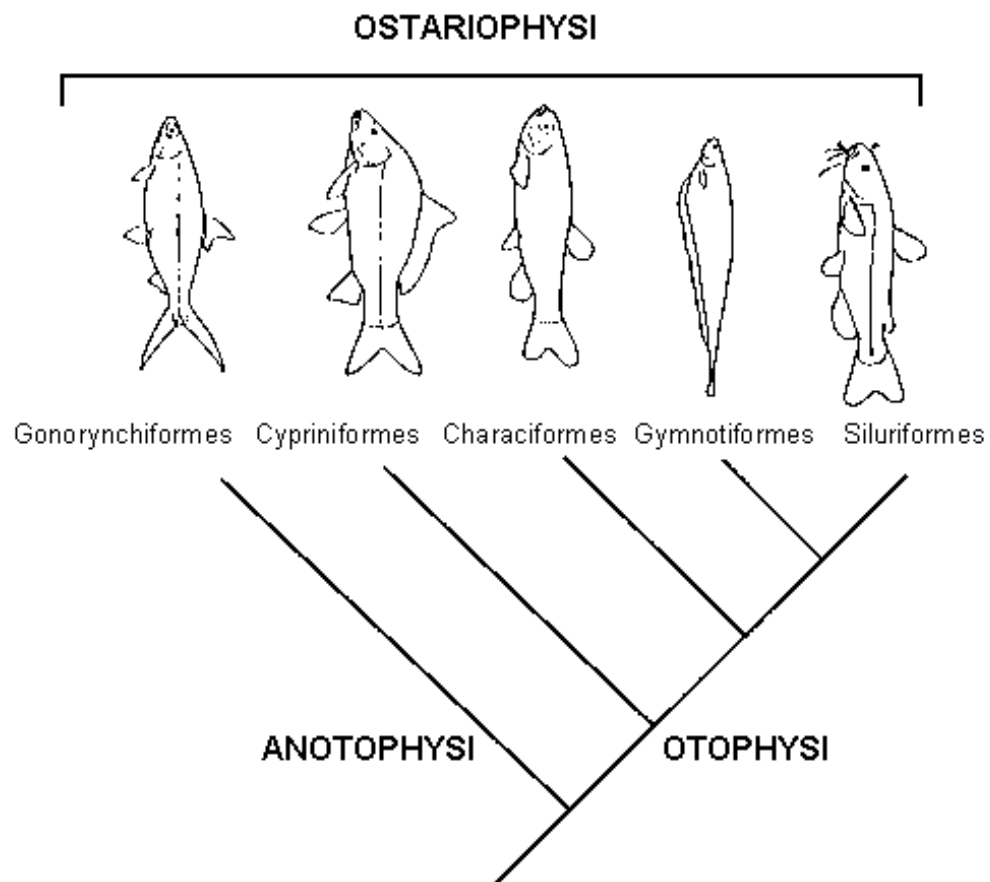


Figura 1: Cladograma das relações entre os grupos constituintes de Ostariophysi, segundo Fink & Fink (1981, 1996).

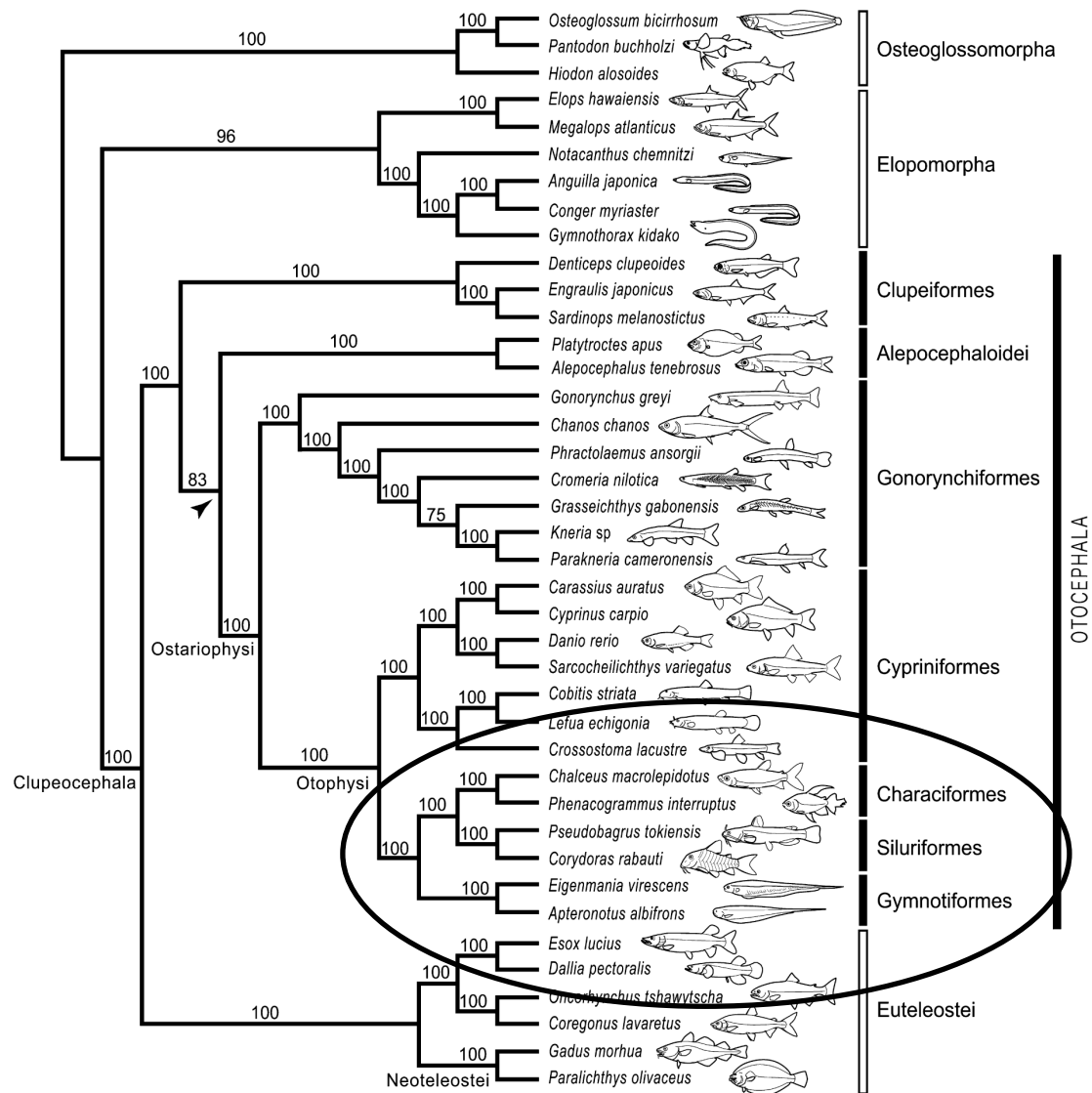


Figura 2: Filogenia dos Teleostei, proposta por Lavoué *et al.*, 2005. Detalhe mostrando as relações entre Gymnotiformes, Characiformes e Siluriformes.

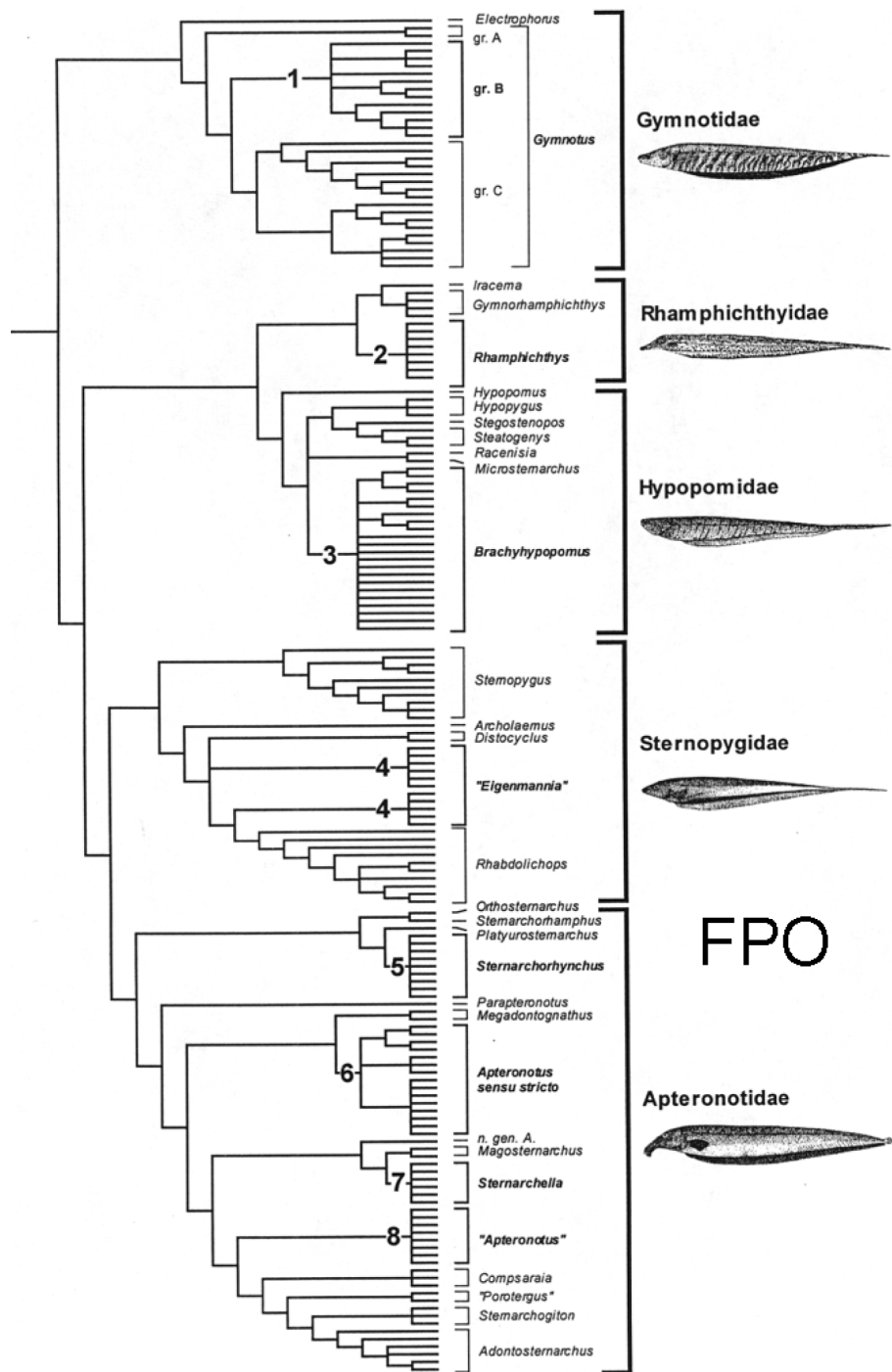


Figura 3: Cladograma mostrando as relações entre os gêneros e famílias de Gymnotiformes, segundo Albert & Crampton (2005).

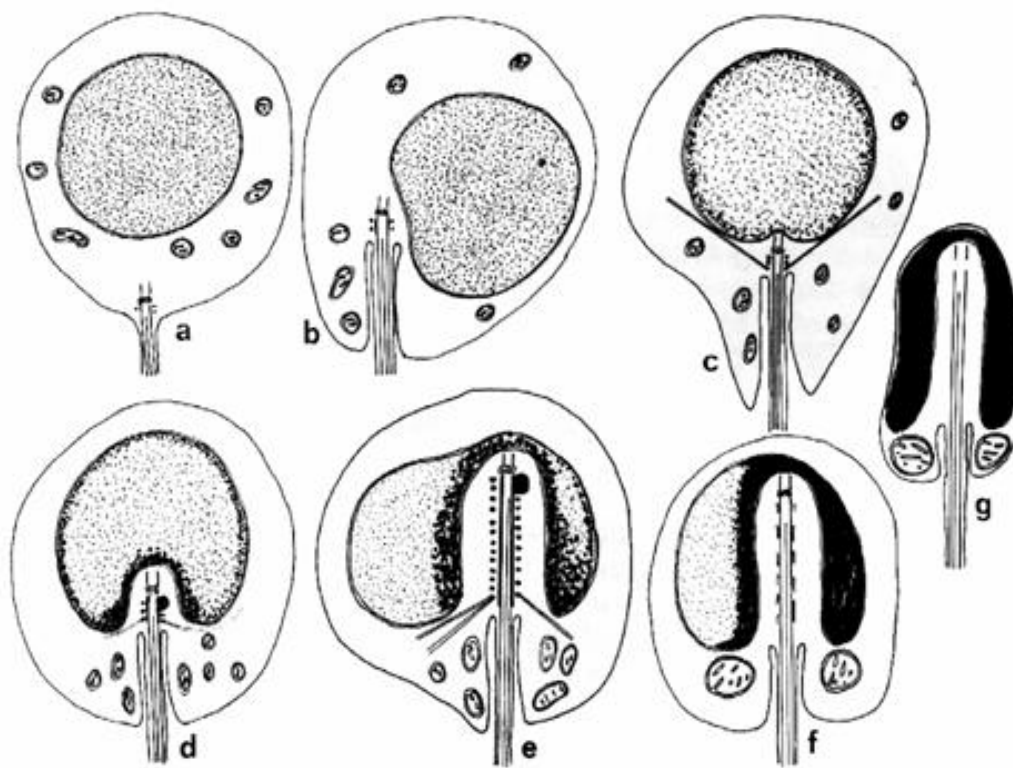


Figura 4: Esquema ilustrando a espermiogênese do tipo I, exemplificada em *Upeneus prayensis* (Mullidae), segundo Mattei (1970).

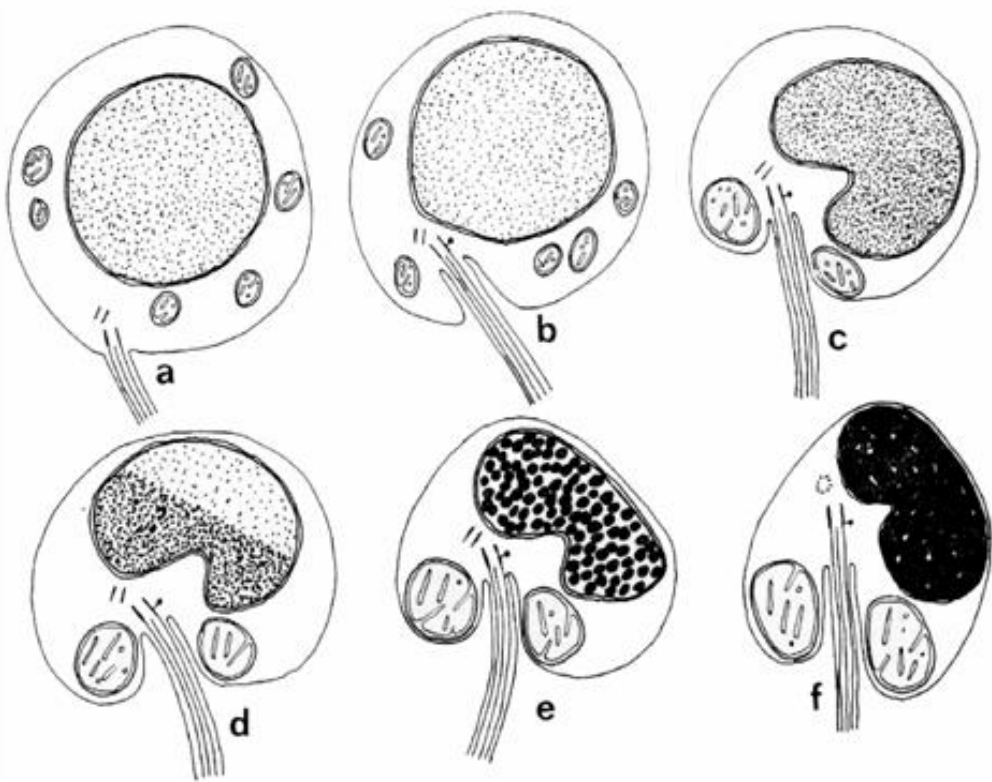


Figura 5: Esquema ilustrando a espermiogênese do tipo II, exemplificada em *Parapristipoma octolineatum* (Haemulidae), segundo Mattei (1970).

2. Objetivos

Foram objetivos do presente estudo:

1. Descrever as características ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides de representantes das famílias de Gymnotiformes, por microscopia eletrônica de transmissão, procurando avaliar o grau de variabilidade das células espermáticas dessas espécies em relação à diversidade do grupo.
2. Realizar estudos comparativos a partir da ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides procurando elaborar hipóteses sobre as relações entre as famílias de Gymnotiformes e dessa ordem com as outras ordens, Characiformes e Siluriformes, as quais estão mais relacionadas com os Gymnotiformes.
3. Comparar as hipóteses obtidas a partir dos dados de ultraestrutura dos espermatozóides com outras hipóteses disponíveis na literatura, elaboradas com base em dados morfológicos e moleculares, verificando se há ou não congruência entre os diferentes conjuntos de caracteres.

3.1 – Capítulo I

Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de *Gymnotus cf. anguillaris* (Gymnotidae) e *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* (Hypopomidae) (Teleostei, Gymnotiformes).

**Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de *Gymnotus cf. anguillaris*
(Gymnotidae) e *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* (Hypopomidae) (Teleostei,
Gymnotiformes)**

Gisleine Fernanda França^{1,2}

Claudio Oliveira²

Irani Quagio-Grassiotto²

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, CP 6109, CEP 13.083-863.

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CP 510, CEP 18.618-000.

Autor para correspondência:

Dra. Irani Quagio-Grassiotto

Depto. de Morfologia, Instituto de Biociências,

Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

Distrito de Rubião Jr, s/n, CP 510, CEP 18.618-000.

Botucatu, SP, Brasil.

E-mail: morfologia@ibb.unesp.br

Fone/Fax: 55 14 3811-6264

Resumo

A ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de representantes de duas famílias de Gymnotiformes, *Gymnotus cf. anguillaris* (família Gymnotidae) e *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* (família Hypopomidae), foram aqui estudadas. O início da espermiogênese em *Gymnotus cf. anguillaris* e *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* é caracterizado pelo desenvolvimento lateral do flagelo e formação de fossa nuclear. Algumas diferenças foram observadas na espermiogênese entre as espécies estudadas neste capítulo, como a ocorrência ou não da rotação nuclear, permanência do canal citoplasmático, tipo e localização da fossa nuclear. No espermatozóide de *Gymnotus cf. anguillaris* o núcleo é esférico com cromatina compactada em filamentos justapostos. A fossa nuclear é rasa e lateral, e está associada ao complexo centriolar através de fibrilas estabilizadoras. A peça intermediária é curta, com vesículas, canal citoplasmático e mitocôndrias alongadas. No espermatozóide de *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* o núcleo, com cromatina compactada em filamentos justapostos, tem formato de semi-arco alongado no sentido posterior e a fossa nuclear é moderada e excêntrica, abrigando totalmente o complexo centriolar. A peça intermediária é média, com vesículas, mitocôndrias alongadas e ausência de canal citoplasmático. Em ambos, o flagelo é lateral em relação ao núcleo e é constituído pelo axonema clássico (9+2) e a membrana flagelar não possui “fins”. Muitas das características observadas nos espermatozóides destes gymnotiformes são visualizadas em algumas espécies de Characiformes.

Palavras chave: Ultraestrutura – espermiogênese – espermatozóide – Gymnotiformes – Gymnotidae – Hypopomidae.

Introdução

Os Gymnotiformes, superordem Ostariophysi, são um importante componente da ictiofauna Neotropical de água doce das Américas do Sul e Central, e ocorrem desde o Sul do México até a Argentina (Mago-Leccia, 1994). Atualmente são reconhecidas 135 espécies, distribuídas em 32 gêneros em cinco famílias (Albert & Crampton, 2005). Rosen & Greenwood (1970) dividiram a superordem Ostariophysi em dois clados, com base na ausência, Anotoptysi (Gonorynchiformes), ou presença, Otoptysi (Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes), do aparelho de Weber. Roberts (1973), em uma revisão de 22 caracteres morfológicos dos Otoptysi, mostrou que os Characiformes eram o grupo irmão dos Gymnotiformes. Fink & Fink (1981, 1996) testando a hipótese anterior sugeriram que os Gymnotiformes sejam grupo irmão de Siluriformes. Dimmick & Larson (1996), numa análise combinada de dados morfológicos e moleculares, corroboraram a hipótese de que os Siluriformes sejam mais relacionados aos Gymnotiformes do que com qualquer outro grupo de Otoptysi. No entanto, quando Dimmick & Larson (1996) analisaram somente os dados moleculares, os Gymnotiformes apareceram como grupo irmão dos Characiformes, e o clado formado por ambos como grupo irmão dos Siluriformes. Resultado semelhante foi obtido por Ortí (1997), analisando seqüências parciais do gene que codifica a proteína ependimina. Mais recentemente, Lavoué *et al.* (2005), com base em análise de dados moleculares provenientes do genoma mitocondrial completo, sugeriram que Siluriformes e Characiformes formam um grupo irmão e esse clado seria por sua vez grupo irmão dos Gymnotiformes.

As relações entre os membros da ordem Gymnotiformes ainda são bastante discutidas. Assim, Triques (1993) e Gayet *et al.* (1994), trabalhando com dados

morfológicos, reconheceram Apterodontidae como o gymnotiforme mais basal, com base na presença de nadadeira caudal. Mago-Leccia (1994), também com base em dados morfológicos, separou a ordem em duas subordens: Sternopygoidei constituída pelas famílias Sternopygidae e Apterodontidae; e Gymnotoidei com as famílias Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Gymnotidae e Electrophoridae. Alves-Gomes *et al.* (1995), a partir da análise combinada de dados moleculares e do sistema eletromotor, concluíram que a família Sternopygidae não formava um grupo natural e propuseram a criação da família Eigenmanniidae. No cladograma apresentado por esses autores a ordem aparece dividida em cinco clados: Sternopygidae, Electrophoridae e Gymnotidae, Hypopomidae e Rhamphichthyidae, Apterodontidae e um novo clado formado pela nova família Eigenmanniidae. Segundo Albert e Crampton (2005), os gêneros *Gymnotus* e *Electrophorus* formam um grupo natural (família Gymnotidae), que corresponde ao grupo irmão dos demais Gymnotiformes, referidos como Sternopygoidei. Rhamphichthyidae e Hypopomidae constituem a superfamília Rhamphichthyoidea, enquanto Sternopygidae e Apterodontidae formam a superfamília Sinusoidea.

Estudos ultraestruturais de espermatozoides de peixes têm mostrado que características da estrutura dos espermatozoides e o processo de espermiogênese podem ser filogeneticamente analisados, disponibilizando importantes dados para a elucidação das relações de parentesco em vários grupos de peixes (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). Embora os estudos de Jamieson (1991) e Mattei (1991) apresentem dados da ultraestrutura dos espermatozoides de praticamente todos os maiores grupos de peixes, os espermatozoides dos Gymnotiformes são ainda praticamente desconhecidos, havendo somente a descrição

da ultraestrutura do espermatozóide de *Apteronotus albifrons* (= *Sternarchus albifrons*) (Jamieson, 1991).

Os padrões comuns e as variações morfológicas dos espermatozóides das diferentes espécies contêm traços filogenéticos e podem, portanto, ser úteis para a elucidação das suas relações de parentesco. No presente estudo a ultraestrutura das células germinativas masculinas de *Gymnotus cf. anguillaris* (Gymnotidae) e *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* (Hypopomidae) foram descritas, comparadas entre si e com os espermatozóides de outros Ostariophysi. Considerações foram feitas com base nas propostas atualmente disponíveis sobre a filogenia desta superordem.

Material e Métodos

Machos adultos de *Gymnotus cf. anguillaris* foram coletados no rio Tietê, distrito de Rio Bonito, Botucatu, São Paulo, Brasil (S 22°37'55.7" W 48°10'30.2"), e *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* no rio Baía, Batayporã, Mato Grosso do Sul, Brasil (S 22°43'19.4" W 53°17'11.3"). Para remoção das gônadas, os animais foram anestesiados por uma solução alcoólica de benzocaína (0,1g/ml) dissolvida em cinco litros de água. Os animais anestesiados foram dissecados por um corte na região ventral para exposição e remoção dos testículos. Os peixes foram fixados em solução aquosa de formol a 10%, preservados em solução aquosa de etanol 70%, identificados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil com os números LBP 2845 e LBP 2645, respectivamente.

Os testículos foram fragmentados e fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0,1M pH 7,3 por pelo menos 12 horas. Para selecionar o material para microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos dos testículos foram cortados e examinados em microscopia de luz utilizando a metodologia convencional. Os fragmentos dos testículos selecionados foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, no escuro, lavados em água destilada, contrastados em bloco com solução aquosa de acetato de uranila a 0,5% e novamente lavados. Seguiu-se, então, a desidratação em série crescente de concentração de acetona e a infiltração por um período de 12 horas em solução 1:1 de mistura de acetona e Araldite. Após a infiltração, os fragmentos de testículos foram pré-incluídos em Araldite, em frasco aberto, colocados em estufa a 37° C por 1 hora, seguindo-se a inclusão em Araldite, em estufa a 58-60° C por 48 horas. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo Ultratome III do LKB, equipado com navalha de diamante, coletados em telas de cobre e contrastados em acetato de uranila a partir de uma solução saturada preparada em etanol 50%, por 20 minutos, no escuro. Após lavagem por várias vezes em álcool 50%, o material foi contrastado em citrato de chumbo por 10 minutos, seguida de lavagem, por várias vezes, em água destilada. Os cortes assim preparados foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips-EM 301 e fotografados em filme 35 mm da Kodak (Eastman 5302). As cópias fotográficas foram feitas em papel fotográfico da Kodak (Kodabrome RC Print).

Resultados

Espermiogênese em *Gymnotus cf. anguillaris*

Em *Gymnotus cf. anguillaris*, o núcleo da espermátide inicial é simetricamente circundado pelo citoplasma, contém cromatina descompactada, difusa e distribuída de forma homogênea (Figs. 1A e B). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo, ancorado na membrana plasmática, e o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal. Este último diferencia-se em corpúsculo basal e dá origem ao flagelo. O complexo centriolar move-se em direção anterior, trazendo parte da membrana plasmática e o segmento inicial do flagelo. Forma-se, assim, o canal citoplasmático, um espaço entre a membrana do flagelo e a membrana plasmática que delimita o citoplasma (Figs. 1B - F). Ao mesmo tempo, o núcleo num movimento discreto de rotação posiciona-se paralelamente ao segmento inicial do flagelo (Fig. 1D). No núcleo, na região voltada para o complexo centriolar forma-se uma reentrância rasa e em arco duplo, a fossa nuclear. A cromatina em condensação forma fibras finas que ocupam progressivamente o núcleo, da periferia para o centro. O citoplasma, contendo as mitocôndrias e demais organelas, desloca-se em direção ao segmento inicial do flagelo, formando uma peça intermediária pouco definida. Inúmeras vesículas surgem na faixa citoplasmática periférica da peça intermediária, junto à membrana plasmática (Figs. 1D e E). Na espermátide final, o núcleo contém cromatina compactada em filamentos justapostos (Fig. 1F).

Espermatozóide de *Gymnotus cf. anguillaris*.

O espermatozóide de *Gymnotus cf. anguillaris* é constituído por uma cabeça e peça intermediária mal definida, e um único flagelo (Figs. 2A e B). Na cabeça, o núcleo arredondado dispõe-se paralelamente ao complexo centriolar e ao segmento inicial do flagelo, e contém cromatina condensada em finos filamentos justapostos. O núcleo é circundado por uma estreita faixa citoplasmática na região oposta ao complexo centriolar e na região anterior, onde não há organelas (Figs. 2A e B). Na região do núcleo voltada para o complexo centriolar há uma depressão em duplo arco, a fossa nuclear. O complexo centriolar, apesar de localizado junto ao núcleo, permanece fora da fossa nuclear (Fig. 2A). Os centríolos conectam-se um ao outro por estruturas estabilizadoras, que também ligam cada centríolo a cada um dos arcos da fossa nuclear (Fig. 2A). O centríolo proximal é anterior e medial em relação ao centríolo distal. A peça intermediária é curta e pouco definida, concentra-se na região médio posterior do núcleo. Contém canal citoplasmático, mitocôndrias alongadas e inúmeras vesículas periféricas que se dispõem numa faixa contínua junto à membrana plasmática (Figs. 2D e E). Microtúbulos irradiam a partir da substância amorfa presente em torno do complexo centriolar para toda a peça intermediária (Figs. 2B e C). As mitocôndrias são separadas do flagelo pelo canal citoplasmático (Fig. 2F). O flagelo lateral e paralelo ao núcleo contém o axonema clássico (9+2) (Fig. 2G).

Espermio gênese em *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus*.

Em *B. pinnicaudatus*, o núcleo da espermátide inicial é simetricamente circundado pelo citoplasma, contém cromatina descompactada, difusa e distribuída de forma homogênea. O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo, ancorado na

membrana plasmática, e o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal. Este último diferencia-se em corpúsculo basal e dá origem ao flagelo. O complexo centriolar move-se em direção anterior, trazendo parte da membrana plasmática e o segmento inicial do flagelo. Forma-se, assim, o canal citoplasmático, um espaço entre a membrana do flagelo e a membrana plasmática da célula (Figs. 3B e C).

A cromatina em condensação forma fibras finas que ocupam de forma progressiva e uniforme todo o núcleo. O citoplasma contendo as mitocôndrias e demais organelas desloca-se em direção ao segmento inicial do flagelo, formando a peça intermediária bem definida.

A rotação nuclear completa-se e o complexo centriolar aloja-se no interior da fossa nuclear. Neste momento o flagelo assume uma posição medial em relação ao núcleo (Fig. 3C). Um novo movimento do núcleo, lateral e em direção posterior, acompanhando o segmento anterior do flagelo, desloca a fossa nuclear e o complexo centriolar para uma posição lateral e anterior na célula espermática (Figs. 3D e F). Simultaneamente a peça intermediária se alonga, e a membrana na região do canal citoplasmático, funde-se à membrana flagelar. O processo resulta no fechamento do canal citoplasmático. Na espermátide final, o núcleo contém cromatina condensada na forma de finos filamentos justapostos (Fig. 3E).

Espermatozóide de *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus*.

O espermatozóide de *B. pinnicaudatus* é constituído por uma cabeça, peça intermediária bem definida, e um único flagelo (Figs. 4A - C). Na cabeça, o núcleo é preenchido por cromatina condensada em finos filamentos justapostos e tem a forma de um

semi-arco alongado no sentido posterior acompanhando o segmento inicial do flagelo (Figs. 4A - C). Na face do núcleo voltada para a peça intermediária, há uma depressão em posição excêntrica, com várias pequenas reentrâncias, a fossa nuclear (Figs. 4A - C). Os centríolos estão inseridos na fossa nuclear e conectados a esta por estruturas fibrilares estabilizadoras, as quais também unem um centríolo ao outro (Figs. 4B - D). O centríolo proximal é anterior e ligeiramente lateral em relação ao centríolo distal. O flagelo é excêntrico em relação ao núcleo (Fig. 4B). A peça intermediária é longa, estreita e assimétrica, contém várias mitocôndrias longas e ramificadas e inúmeras vesículas (Figs. 4C, E e F). Na peça intermediária, feixes de microtúbulos dispostos no sentido longitudinal situam-se nas proximidades do axonema (Figs. 4B, E e F). O segmento anterior do flagelo, que emerge da peça intermediária, é acompanhado por compartimento membranoso constituído por inúmeras vesículas que envolvem o axonema (Fig. 4G). Em seu segmento posterior o flagelo contém apenas o axonema clássico (9+2) (Fig. 4H).

Discussão

Há dois tipos de espermiogênese descritas para os Teleostei, classificados de acordo com a ocorrência (tipo I) ou não da rotação nuclear (tipo II), em relação ao flagelo, durante a espermiogênese (Mattei, 1970). No tipo I, a rotação faz com que o núcleo posicione-se sobre o complexo centriolar e, como resultado, o eixo flagelar torna-se perpendicular à base do núcleo. No tipo II, a rotação nuclear não ocorre e o flagelo permanece lateral em relação ao núcleo. Em geral, nas espermátides iniciais, o complexo centriolar, ancorado na membrana plasmática, posiciona-se lateralmente ao núcleo. Os dois tipos de espermiogênese, *sensu* Mattei (1970), são encontrados nos Gymnotiformes aqui

analisados. Em *Gymnotus cf. anguillaris* a espermiogênese é do tipo II. Entre os Ostariophysi, nos quais a espermiogênese encontra-se descrita, os únicos registros existentes de espermiogênese do tipo II referem-se aos Characiformes da família Acestrorhynchidae (Matos *et al.*, 2000) e na subfamília Glandulocaudinae, nas espécies de inseminação (Burns & Weitzman, 2005). Já em *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* a espermiogênese é do tipo I, este tipo de espermiogênese é tido como o mais comum entre os Teleostei (Mattei, 1970). No entanto, a espermiogênese em *B. pinnicaudatus* assume um aspecto bastante peculiar, pois, após a rotação, o núcleo das espermatídes sofre um alongamento lateral e posterior. Curiosamente, entre os Ostariophysi, esta é uma característica da espermiogênese relatada entre os Characiformes pertencentes à família Characidae, especificamente nas espécies com inseminação da subfamília Glandulocaudinae (Burns *et al.*, 1998; Pecio & Rafinski, 1999; Burns & Weitzman, 2005; Pecio *et al.*, 2005). Porém, o alongamento do núcleo nos Glandulocaudinae é muito mais acentuado do que aquele que ocorre em *B. pinnicaudatus*. Outra particularidade da espermiogênese em *B. pinnicaudatus* é o fechamento do canal citoplasmático. Mais uma vez, registros de espermiogênese com fechamento de canal citoplasmático são encontrados entre os Characiformes da família Erythrinidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2000a) e no gênero *Triportheus* da família Characidae (Gusmão-Pompiani, 2003), mas não ocorre nos Glandulocaudinae (Burns *et al.*, 1998; Pecio & Rafinski, 1999; Burns & Weitzman, 2005; Pecio *et al.*, 2005). Já entre os Siluriformes, o fechamento do canal citoplasmático durante a espermiogênese encontra-se relatado para a família Diplomystidae, *Diplomystes mesembrinus* (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001b).

Além dos dois tipos de espermiogênese, os representantes das famílias de Gymnotiformes analisados neste capítulo possuem espermatozóides que, apesar de terem em comum algumas características, diferem em várias outras. Assim, estes espermatozóides apresentam o mesmo padrão de compactação da cromatina, a assimetria da peça intermediária, forma e quantidade de mitocôndrias. Diferem quanto à forma e à posição do núcleo em relação ao flagelo; forma e posição da fossa nuclear; comprimento da peça intermediária; presença do canal citoplasmático, presença de compartimento membranoso no segmento inicial do flagelo.

O padrão de compactação da cromatina nos espermatozóides dos Teleostei depende do tipo de proteína associada ao DNA (Saperas *et al.*, 1993). Compactação em finos filamentos justapostos, como o presente em *Gymnotus cf. anguillaris* e em *B. pinnicaudatus*, é encontrado na grande maioria dos Teleostei (Jamieson, 1991; Mattei, 1991) em vários representantes dos Characiformes, como os pertencentes às famílias Erythrinidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001a), Curimatidae (Matos *et al.*, 1998; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003) e Acestrorhynchidae (Matos *et al.*, 2000). Ocorre também em várias espécies de Characidae com ou sem inseminação (Burns *et al.*, 1998; Pecio & Rafinski, 1999; Gusmão-Pompiani, 2003; Burns & Weitzman, 2005; Pecio *et al.*, 2005).

Dentre os Ostariophysi, espermatozóides que compartilham o maior número de características com os de *Gymnotus cf. anguillaris* são aqueles encontrados em *Acestrorhynchus falcatus*, Acestrorhynchidae, Characiformes (Matos *et al.*, 2000). Tanto em *Gymnotus cf. anguillaris* como em *Acestrorhynchus falcatus* os espermatozóides são do tipo II (*sensu* Mattei, 1970). Outras características comuns a essas duas espécies são o padrão de compactação da cromatina em finos filamentos justapostos, a peça intermediária pouco

definida envolvendo e concentrando-se a partir da região médio posterior do núcleo e a presença do canal citoplasmático. Suas principais diferenças estão na presença da fossa nuclear, no grau de desenvolvimento das estruturas estabilizadoras dos centríolos, na forma das mitocôndrias e na maior quantidade e distribuição periférica das vesículas na peça intermediária dos espermatozóides de *Gymnotus cf. anguillaris* em relação aos espermatozóides de *A. falcatus*.

Já o espermatozóide de *B. pinnicaudatus*, a despeito de compartilhar com os espermatozóides de inseminação dos Characidae da subfamília Glandulocaudinae (Burns *et al.*, 1998; Pecio & Rafinski, 1999; Burns & Weitzman, 2005; Pecio *et al.*, 2005) a forma do núcleo, alongado em sentido posterior e a presença de feixes de microtúbulos na peça intermediária, em outros aspectos é mais similar ao encontrado no espermatozóide de *Triportheus paranensis*, Characiformes (Gusmão-Pompiani, 2003). Entre as características comuns à *B. pinnicaudatus* e *T. paranensis* estão a peça intermediária média e sem canal citoplasmático e a forma e quantidade de mitocôndrias. A ausência de canal citoplasmático na peça intermediária, como resultado de fechamento durante a espermiogênese, está presente também nos espermatozóides dos Erythrinidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001a), uma das famílias mais basais entre os Characiformes Neotropicais (Calcagnotto *et al.*, 2005), além de ocorrer em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001b) a família mais basal de Siluriformes (de Pinna, 1998).

As várias características ultraestruturais compartilhadas pelos espermatozóides dos Gymnotiformes aqui analisados com aqueles de representantes de algumas famílias e subfamílias de Characiformes, sugerem que os Gymnotiformes estão mais relacionados aos Characiformes do que aos Siluriformes.

Referências Bibliográficas

- Albert, J. S. & Crampton, W. G. R. (2005). Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In *Electroreception* (Bullock, T. E., Hopkins, C. D., Popper, A. N. & Fay, F. R., eds.), pp. 306-403. Ithaca: Cornell University Press.
- Alves-Gomes, J. A., Ortí, G., Haygood, M. & Heiligenberg, W. (1995). Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and evolution of their system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* **12**, 298-318.
- Burns, J. R., Weitzman, S. H., Lange, K. R. & Malabarba, L. R. (1998). Sperm ultrastructure in characid fishes (Teleostei, Ostariophysi). In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S., eds.), pp. 235-244. Porto Alegre: Edipucrs.
- Burns, J. R., Meisner, A. D., Weitzman, S. H. & Malabarba, L. R. (2002). Sperm and spermatocyte ultrastructure in the inseminating catfish, *Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysi: Siluriformes, Auchenipteridae). *Copeia* **2002**, 173-179.
- Burns, J. R. & Weitzman, S. H. (2005). Insemination in ostariophysian fishes. In *Viviparous fishes* (Grier, H. J. & Uribe, M. C., eds.), pp. 107-134. Florida: New Life Publications.
- Calcagnotto D., Schaefer, S. A. & DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**, 135-153.

- Dimmick, W. W. & Larson, A. (1996). A molecular and morphological perspective on the phylogenetic relationships of the Otophysian fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**, 120-133.
- Emel'yanova, N. G. & Makeyeva, A. P. (1991a). Morphology of the gametes of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Voprosy Iktiologii* **31**, 143-148.
- Emel'yanova, N. G. & Makeyeva, A. P. (1991b). Ultrastructure of spermatozooids of some representative catfishes. *Voprosy Iktiologii* **31**, 1014-1019.
- Fink, S. V. & Fink, W. L. (1981). Interrelationships of the Ostariophysian fishes (Teleostei). *Zoology Journal Linnean Society* **72**, 297-353.
- Fink, S. V. & Fink, W. L. (1996). Interrelationships of Ostariophysan fishes. In *Interrelationships of Fishes* (Stiassny, M.L.J., Parenti, L.R. & Johnson, G.D., eds.), pp. 209-249. San Diego: Academic press.
- Gayet, M., Meunier, F. J. & Kirschbaum, F. (1994). *Ellisella kirschbaumi* Gayet & Meunier, 1991, gymnotiforme fossile de Bolivie et ses relations phylogenetiques au sein des formes actuelles. *Cybium* **18**, 273-306.
- Gusmão-Pompiani, P. (2003). Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da Ordem Characiformes, Família Characidae (Teleostei, Ostariophysi) uma abordagem filogenética. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Jamieson, B. G. M. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Kim, K. H. & Lee, Y. H. (2000). The ultrastructure of spermatozoa of the ussurian bulhead, *Leiocassis ussuriensis* (Teleostei, Siluriformes, Bagridae) with phylogenetic considerations. *Korean Journal of Limnology* **33**, 405-412.
- Lee, Y. H. (1998). The ultrastructure of spermatozoa in the bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* (Teleostei, Siluriformes, Bagridae). *Korean Journal of Electron Microscopy* **28**, 39-48.
- Lavoué, S., Miya, M., Inoue, J. G., Saitoh, K., Ishiguro, N. B. & Nishida, M. (2005). Molecular systematics of the gonorynchiform fishes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences: Implications for higher-level relationships within the Otocephala. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**, 165-177.
- Mago-Leccia, F. (1994). *Electric Fishes of the Continental Waters of America*. Venezuela: FUDECI.
- Matos, E., Matos, P., Santos M. N. S. & Azevedo, C. (1998). Aspectos morfológicos e ultraestruturais do espermatozóide de *Curimata inornata* Vari, 1989 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. *Acta Amazônica* **28**, 449-453.
- Matos, E., Matos, P., Corral, L. & Azevedo, C. (2000). Estrutura fina do espermatozóide de *Acestrorhyncus falcatus* Bloch (Teleostei, Characidae) da região norte do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **17**, 747-752.
- Mattei, X. (1970). Spermiogénese comparé des poisson. In *Comparative Spermatology* (Baccetti, B., ed.), pp. 57-72. New York: Academic Press.
- Mattei, X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 3038-3055.

- Ortí, G. (1997). Radiation of Characiform Fishes: Evidences from Mitochondrial and Nuclear DNA sequences. In *Molecular Systematics of Fishes* (Kocher, T. D. & Stepien, C. A., eds.), pp. 219-243. San Diego: Academic Press.
- Pecio, A. & Rafinski, J. (1999). Spermiogenesis in *Mimagoniates barberi* (Teleostei, Ostariophysi, Characidae), an oviparous, internally fertilizing fish. *Acta Zoologica* **80**, 35-45.
- Pecio, A., Burns, J. R. & Weitzman, S. H. (2005). Sperm and spermatocyte ultrastructure in the inseminating species *Tytocharax coxii*, *T. tambopatesensis*, and *Scopaeocharax rhinodus* (Pisces: Teleostei: Characidae: Glandulocaudine: Xenobryconini). *Journal of Morphology* **26**, 216-226.
- de Pinna, M. C. C. (1998). Phylogenetic relationship of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical overviews and synthesis of hypotheses. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S., eds.), pp. 279-330. Porto Alegre: Edipucrs.
- Quaggio-Grassiotto, I. & Carvalho, E. D. (2000). Ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermiogenesis. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology* **32**, 654-659.
- Quaggio-Grassiotto, I., Negrão, J. N. C., Carvalho, E. D. & Foresti, F. (2001a). Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *Journal of Fish Biology* **59**, 1494-1205.
- Quaggio-Grassiotto, I., Oliveira, C. & Gosztanyi, A. E. (2001b). The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. *Journal of Fish Biology* **58**, 1623-1632.

- Quagio-Grassiotto, I., Gameiro, M. C., Schneider, T., Malabarba, L.R. & Oliveira, C. (2003). Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of Curimatidae with some consideration on Characiformes spermatozoal ultrastructure. *Neotropical Ichthyology* **1**, 35-45.
- Quagio-Grassiotto, I., Spadella, M. A., Carvalho, M. & Oliveira, C. (2005). Comparative description and discussion of spermiogenesis and spermatozoal ultrastructure in some species of Heptapteridae and Pseudopimelodidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology* **3**, 401-410.
- Roberts, T. (1973). Interrelationships of ostariophysian. In *Interrelationships of fishes* (Greenwood, P. H., Miles, R. S. & Patterson, C., eds.), pp. 373-395. San Diego: Academic Press.
- Rosen, D. E. & Greenwood, P. H. (1970). Origin of the Weberian apparatus and the relationships of the ostariophysian and gonorynchiform fishes. *American Museum Novitates* **2428**, 1-25.
- Santos, J. E., Bazzoli, N., Rizzo, E. & Santos, G. B. (2001). Mophofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lutken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue and Cell* **33**, 533-540.
- Saperas, N., Ribes, E., Buesa, C., Garcia-Hegart, F. & Chiva, M. (1993). Differences in chromatin condensation during spermiogenesis in two species of fish with distinct protamines. *Journal Experimental Zoology* **265**, 185-194.
- Triques, M. L. (1993). Filogenia dos gêneros de Gymnotiformes (Actinopteryigii, Ostariophysi), com base em caracteres esqueléticos. *Comunicações do Museu de Ciências* **6**, 85-130.

Legenda Figuras:

Figura 1: Espermiogênese em *Gymnotus cf. anguillaris*. **Figs. A e B** – Espermátides iniciais, 13800x, 13600x, respectivamente; **Fig. C** – Peça intermediária em espermátide, 13600x; **Fig. D** – Espermátide em corte longitudinal, 23000x; **Fig. E** – Espermátide em corte transversal, 31500x; **Fig. F** – Espermátide final, 22100x.

Figura 2: Espermatozóide de *Gymnotus cf. anguillaris*. **Figs. A e B** – Espermatozóides em cortes longitudinais, 22050x, 31500x, respectivamente; **Fig. C e E** – Cortes transversais, 42000x, 23500x, 17000x, respectivamente; **Fig. F** – Peça intermediária, 13800x; **Fig. G** – Corte transversal do flagelo, 63000x.

Figura 3: Espermiogênese em *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus*. **Figs. A** – Espermátide inicial, 9750x; **Fig. B a D** – Espermátide em corte longitudinal, 13250x, 23000x, 25200x, respectivamente; **Fig. E** – Peça intermediária, 25200x; **Fig. F** – Espermátide final, 22100x.

Figura 4: Espermatozóide de *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus*. **Figs. A a C** – Espermatozóides em cortes longitudinais, 23000x, 23000x, 23000x, respectivamente; **Fig. D** – Detalhe do complexo centriolar, 46000x; **Fig. E** – Corte transversal, 18900x; **Fig. F** – Peça intermediária, 42000x; **Fig. G** – Corte longitudinal do flagelo, 17000x; **Fig. H** – Corte transversal do flagelo, 31500x.

Abreviaturas

A: axonema, **C:** centríolo, **D:** centríolo distal, **F:** flagelo, **M:** mitocôndrias, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **V:** vesículas, **seta dupla:** fossa nuclear, **seta branca:** estruturas de estabilização do complexo centriolar, **seta preta:** canal citoplasmático, **asterisco:** feixe de microtúbulos.

Figura 1

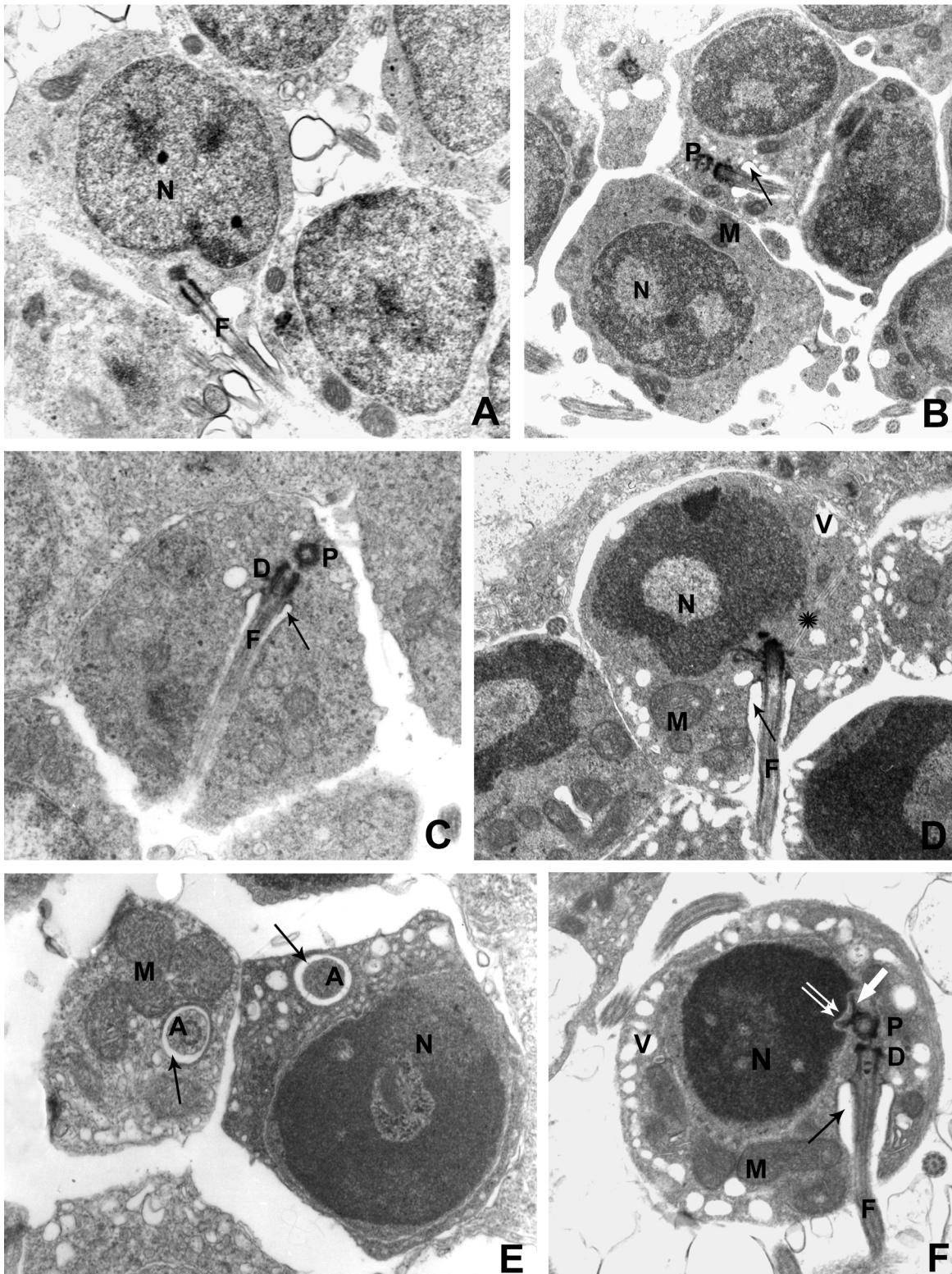


Figura 2

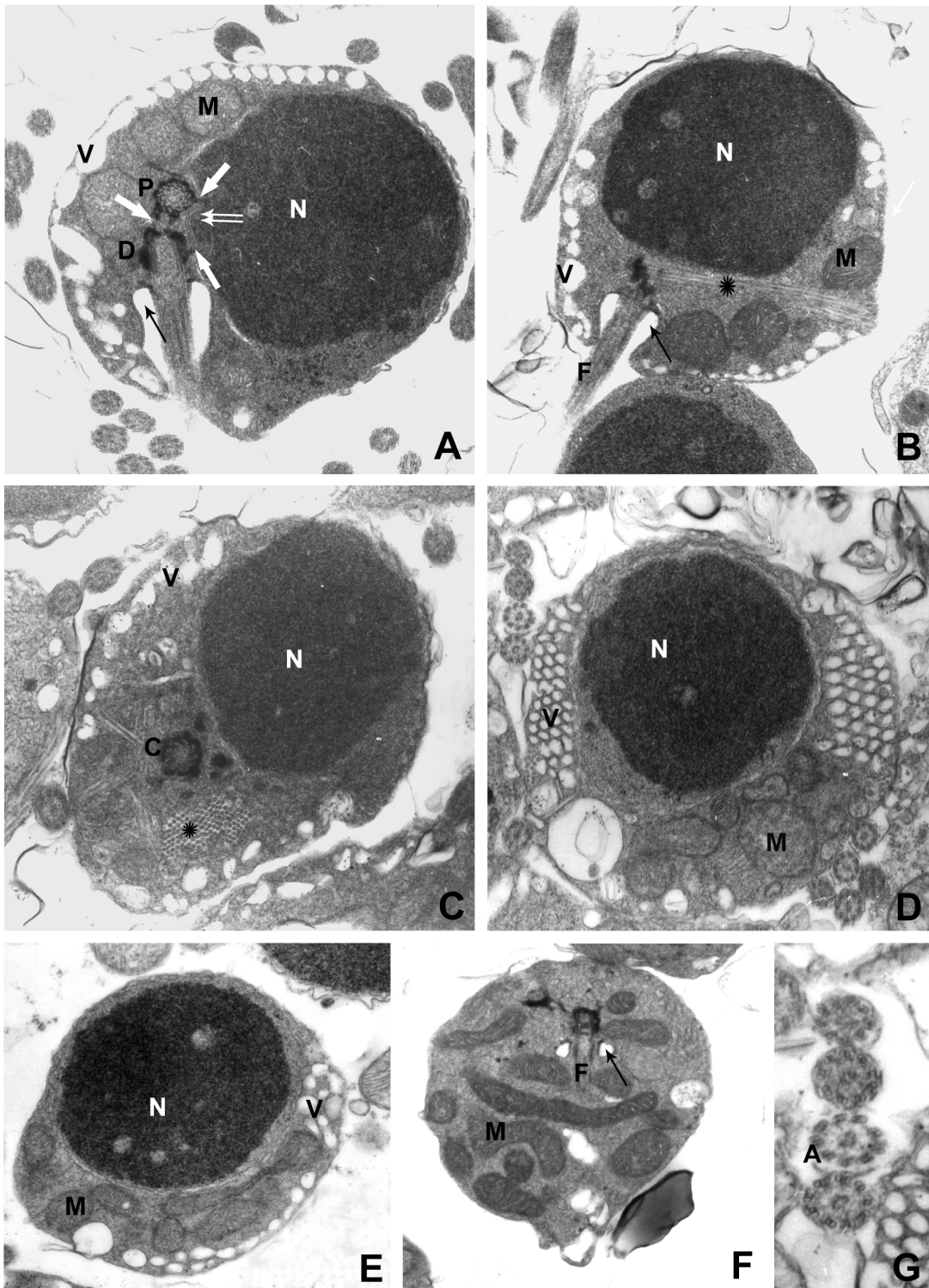


Figura 3

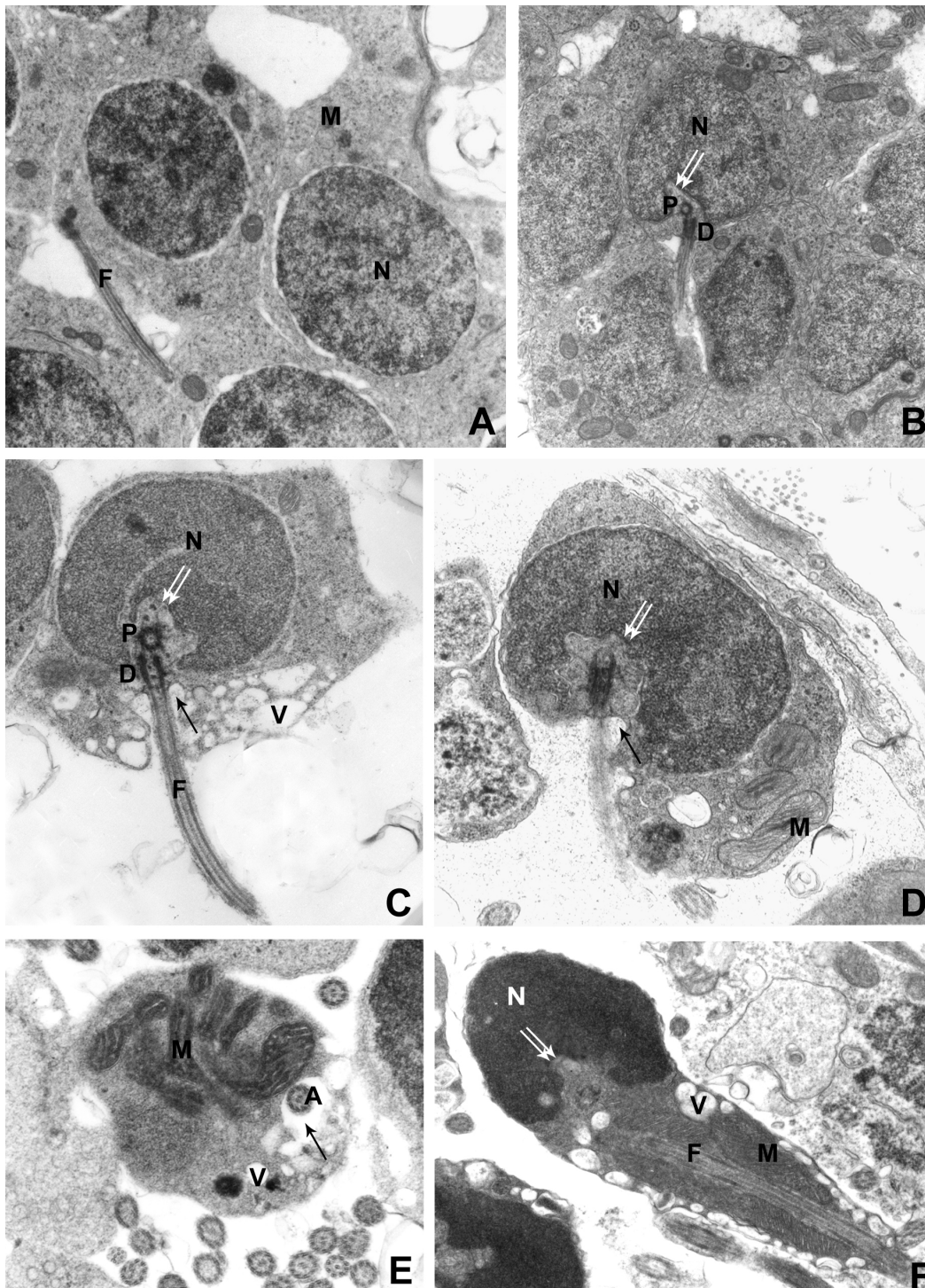
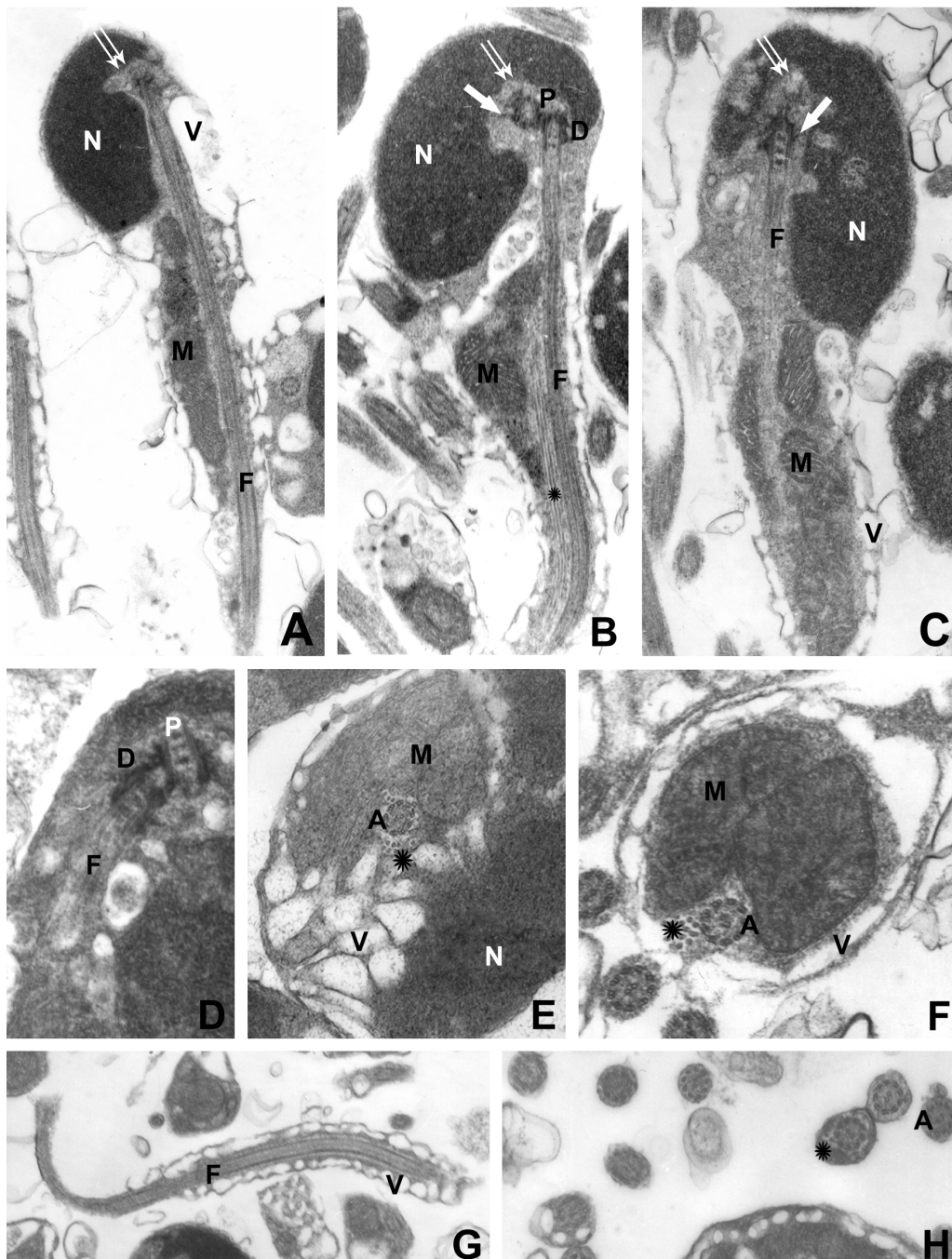


Figura 4



3.2 – Capítulo II

Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de Rhamphichthyidae,
Sternopygidae, Aptereronotidae (Teleostei, Gymnotiformes).

**Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de Rhamphichthyidae,
Sternopygidae e Apternotidae (Teleostei, Gymnotiformes)**

Gisleine Fernanda França^{1,2}

Claudio Oliveira²

Irani Quagio-Grassiotto²

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, CP 6109, CEP 13.083-863.

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CP 510, CEP 18.618-000.

Autor para correspondência:

Dra. Irani Quagio-Grassiotto

Depto. de Morfologia, Instituto de Biociências,

Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

Distrito de Rubião Jr, s/n, CP 510, CEP 18.618-000.

Botucatu, SP, Brasil.

E-mail: morfologia@ibb.unesp.br

Fone/Fax: 55 14 3811-626

Resumo

A espermiogênese em *Rhamphichthys cf. hahni*, *Eigenmannia cf. virescens* (1), *Eigenmannia cf. virescens* (2) e *Apteronotus cf. albifrons* é caracterizada pelo desenvolvimento lateral do flagelo, rotação nuclear, compactação da cromatina em filamentos de diferentes espessuras, formação de fossa nuclear e canal citoplasmático. Nos representantes das famílias Rhamphichthyidae e Sternopygidae o canal citoplasmático, fecha-se parcialmente durante a espermiogênese. Nos espermatozóides, o núcleo é esférico e a cromatina está compactada em feixes filamentosos. A fossa nuclear é do tipo moderada e localizada medialmente ao núcleo, abrigando totalmente o complexo centriolar. A peça intermediária é assimétrica, com mitocôndrias alongadas e vesículas, sendo as últimas mais numerosas em *Rhamphichthys cf. hahni*. O canal citoplasmático está presente somente na região da bainha, exceto no Apteronotidae em que está presente em toda a extensão da peça intermediária. A bainha está presente em todos os espermatozóides estudados, mas é especialmente longa em *Apteronotus cf. albifrons*. O flagelo contém o axonema clássico (9+2), e a membrana flagelar apresenta “fins”, exceto no representante da família Apteronotidae. Há muitas semelhanças entre as espécies estudadas, e tais características são visualizadas em algumas espécies de Characiformes.

Palavras chaves: Ultraestrutura – espermiogênese – espermatozóide – Gymnotiformes – Rhamphichthyidae – Sternopygidae – Apteronotidae.

Introdução

Os Gymnotiformes, superordem Ostariophysi, são um importante componente da ictiofauna Neotropical de água doce das Américas do Sul e Central, e ocorrem desde o sul do México até a Argentina (Mago-Leccia, 1994). Atualmente são reconhecidas 135 espécies, distribuídas em 32 gêneros em cinco famílias (Albert & Crampton, 2005). Rosen & Greenwood (1970) dividiram a superordem Ostariophysi em dois clados, com base na ausência, Anotoptysi (Gonorynchiformes), ou presença, Otoptysi (Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes and Gymnotiformes), do aparelho de Weber. Roberts (1973), em uma revisão de 22 caracteres morfológicos dos Otoptysi, mostrou que os Characiformes era o grupo irmão dos Gymnotiformes. Fink & Fink (1981, 1996) testando a hipótese anterior mostraram que os Gymnotiformes eram grupo irmão de Siluriformes. Dimmick & Larson (1996) numa análise combinada de dados morfológicos e moleculares corroboraram a hipótese de que os Siluriformes eram mais relacionados aos Gymnotiformes do que com qualquer outro grupo de Otoptysi. No entanto, quando Dimmick & Larson (1996) analisaram somente os dados moleculares, os Gymnotiformes apareceram como grupo irmão dos Characiformes, e o clado formado por ambos como grupo irmão dos Siluriformes. Resultado semelhante foi obtido por Ortí (1997), analisando seqüências parciais do gene que codifica a proteína ependimina. Mais recentemente, Lavoué *et al.* (2005), com base em análise de dados moleculares provenientes do genoma mitocondrial completo, sugeriram que Siluriformes e Characiformes formam um grupo irmão e esse clado seria por sua vez grupo irmão dos Gymnotiformes.

As relações entre os membros da ordem Gymnotiformes ainda são bastante discutidas. Assim, Triques (1993) e Gayet *et al.* (1994), trabalhando com dados

morfológicos, reconheceram Apterodontidae como o gymnotiforme mais basal, com base na presença de nadadeira caudal. Mago-Leccia (1994), também com base em dados morfológicos, separou a ordem em duas subordens: Sternopygoidei constituída pelas famílias Sternopygidae e Apterodontidae; e Gymnotoidei com as famílias Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Gymnotidae e Electrophoridae. Alves-Gomes *et al.* (1995), a partir da análise combinada de dados moleculares e do sistema eletromotor, concluíram que a família Sternopygidae não formava um grupo natural e propuseram a criação da família Eigenmanniidae. No cladograma apresentado por esses autores a ordem aparece dividida em cinco clados: Sternopygidae, Electrophoridae e Gymnotidae, Hypopomidae e Rhamphichthyidae, Apterodontidae e um novo clado formado pela nova família Eigenmanniidae. Segundo Albert & Crampton (2005), os gêneros *Gymnotus* e *Electrophorus* formam um grupo natural (família Gymnotidae), que corresponde ao grupo irmão dos demais Gymnotiformes, referidos como Sternopygoidei. Rhamphichthyidae e Hypopomidae constituem a superfamília Rhamphichthyoidea, enquanto Sternopygidae e Apterodontidae formam a superfamília Sinusoidea.

Estudos ultraestruturais de espermatozoides de peixes têm mostrado que características da estrutura dos espermatozoides e o processo de espermiogênese podem ser filogeneticamente analisados, disponibilizando importantes dados para a elucidação das relações de parentesco em vários grupos de peixes (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). Embora os estudos de Jamieson (1991) e Mattei (1991) apresentem dados da ultraestrutura dos espermatozoides de praticamente todos os maiores grupos de peixes, os espermatozoides dos Gymnotiformes são ainda praticamente desconhecidos, havendo somente a descrição

da ultraestrutura do espermatozóide de *Apteronotus albifrons* (= *Sternarchus albifrons*) (Jamieson, 1991).

Os padrões comuns e as variações morfológicas dos espermatozóides das diferentes espécies contem traços filogenéticos e podem, portanto, ser úteis para a resolução das suas relações de parentesco. Assim a ultraestrutura das células germinativas masculinas de *Rhamphichthys cf. hahni* (Rhamphichthyidae), *Apteronotus cf. albifrons* (Apteronotidae), *Eigenmannia cf. virescens* (1) e *Eigenmannia cf. virescens* (2). (Sternopygidae) foram descritas, comparadas entre si e com aquelas dos espermatozóides de outros Ostariophysi. Considerações foram feitas com base nas propostas atualmente disponíveis sobre a filogenia desta superordem.

Material e Métodos

Machos adultos de *Rhamphichthys cf. hahni* (LBP 3102) foram coletados no Rio Baía, Batayporã, Mato Grosso do Sul, Brasil (S 22°43'19.4" W 53°17'11.3"), *Eigenmannia cf. virescens* (2) (LBP 2460) e *Apteronotus cf. albifrons* (LBP 2440) no córrego Fundo, Barra do Garça, Mato Grosso – Brasil (S 15°52'40.4" W 52°18'15.5"), e *Eigenmannia cf. virescens* (1) no Rio Alambari, (LBP 2849) Botucatu, São Paulo, Brasil (S 22°45'48.2" W 48°15'41.8"). Para remoção das gônadas os animais foram anestesiados por uma solução alcoólica de benzocaína (0,1g/ml) dissolvida em cinco litros de água. Os animais anestesiados foram dissecados por um corte na região ventral para exposição e remoção dos testículos. Os peixes foram fixados em solução aquosa de formol a 10%, preservados em solução aquosa de etanol 70%, identificados e depositados na coleção de peixes do

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Os testículos foram fragmentados e fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0,1M pH 7,3 por pelo menos 12 horas. Para selecionar o material para a microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos dos testículos foram cortados e examinados em microscopia de luz utilizando a metodologia convencional. Os fragmentos dos testículos selecionados foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, no escuro, lavados em água destilada, contrastados em bloco com solução aquosa de acetato de uranila a 0,5% e novamente lavados. Seguiu-se, então, a desidratação em série crescente de concentração de acetona e a infiltração por um período de 12 horas em solução 1:1 de mistura de acetona e Araldite. Após a infiltração, os fragmentos de testículos foram pré-incluídos em Araldite, em frasco aberto, colocados em estufa a 37° C por 1 hora, seguindo-se a inclusão em Araldite, em estufa a 58-60° C por 48 horas. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo Ultratome III do LKB, equipado com navalha de diamante, coletados em telas de cobre, e contrastados em acetato de uranila a partir de uma solução saturada preparada em etanol 50%, por 20 minutos, no escuro. Após lavagem por várias vezes em álcool 50%, o material sofreu nova contrastação em citrato de chumbo por 10 minutos, seguida de lavagem, por várias vezes, em água destilada. Os cortes assim preparados foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips-EM 301 e fotografados em filme 35 mm da Kodak (Eastman 5302). As cópias fotográficas foram feitas em papel fotográfico da Kodak (Kodabrome RC Print).

Resultados

Espermiogênese em *Rhamphichthys cf. hahni*, *Eigenmannia cf. virescens* (1), *Eigenmannia cf. virescens* (2) e *Apteronotus cf. albifrons*.

Em todas as espécies estudadas neste capítulo, a espermiogênese apresenta o mesmo padrão. Nas espermátides iniciais, o núcleo, simetricamente circundado pelo citoplasma, contém cromatina descompactada, difusa e distribuída de forma homogênea (Figs. 1A, 2A, 3A e 4A). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo (Figs. 1A, 2A, 3A e 4A). No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal. Este último diferencia-se em corpúsculo basal e dá origem ao flagelo. O complexo centriolar move-se em direção anterior, trazendo parte da membrana plasmática e o segmento inicial do flagelo. Forma-se assim, o canal citoplasmático, um espaço entre o flagelo e a membrana plasmática (Figs. 1B - D, 2B e C, 3B e C, 4A - F). Ao mesmo tempo, o núcleo sofre um movimento de rotação, direcionado para o segmento inicial do flagelo. No núcleo em rotação, na região voltada para o complexo centriolar, surge uma reentrância, a fossa nuclear (Figs. 1B - D; 2B e F; 3B, C, E - H; 4C, E e G). A cromatina compacta-se gradualmente formando grumos filamentosos (Figs. 1A - C, 2A - C, 4A - C). O citoplasma, contendo as mitocôndrias e demais organelas, desloca-se em direção ao segmento inicial do flagelo, formando a peça intermediária. Um sistema de membranas, na forma de anéis concêntricos, organiza-se internamente à membrana plasmática que circunda o canal citoplasmático (Figs. 1E, 3D e 4D). A membrana plasmática, na extremidade final da peça intermediária, projeta-se formando um colarinho ou bainha ao redor do flagelo (Figs. 1G, 2E, 3F e G, 4J).

Alguns acontecimentos da espermiogênese são visualizados somente nos representantes de Rhamphichthyidae e Sternopygidae, tais como, fusão da membrana do canal citoplasmático com a flagelar ocasionando fechamento parcial do canal citoplasmático, o qual permanece apenas na região da bainha (Figs. 1G, 2E e G, 3E a G), e a projeção lateral da membrana do flagelo formando “fins” (Figs. 1K, 2I e 3J).

Espermatozóides de *Rhamphichthys cf. hahni*, *Eigenmannia cf. virescens* (1), *Eigenmannia cf. virescens* (2) e *Apteronotus cf. albifrons*.

Os espermatozóides de todas as espécies, analisadas neste capítulo, são constituídos por uma cabeça, peça intermediária e flagelo bem definidos. Na cabeça, ligeiramente lateral e esférica, o núcleo arredondado contém cromatina compactada na forma de feixes filamentosos. A fossa nuclear é medial, perpendicular ao núcleo e de profundidade moderada. O complexo centriolar insere-se totalmente na fossa nuclear (Figs. 1D, 2F, 3H e 4G). A orientação dos centríolos um em relação ao outro, e suas estruturas de estabilização (material elétron denso e microfibrilas) mostram algumas diferenças dependendo da espécie. O centríolo proximal é anterior e lateral em relação ao centríolo distal, em *R. cf. hahni*, *E. cf. virescens* (2) e *E. cf. virescens* (1) (Figs. 1D, 2F e 3H). Nestas espécies, estruturas de estabilização unem o centríolo distal diretamente ao envoltório nuclear no teto da fossa nuclear. O centríolo proximal também conecta-se ao envoltório nuclear na altura da fossa nuclear por estruturas de estabilização (Figs. 1D, 2F e 3H). Já em *A. cf. albifrons* o centríolo proximal é anterior e medial em relação ao centríolo distal, e as estruturas de estabilização irradiam de ambos os centríolos e os ancoram no envoltório nuclear na altura da fossa nuclear (Fig. 4G).

Em todas as espécies analisadas, a peça intermediária é assimétrica, e contém as mitocôndrias e algumas poucas vesículas (Figs. 2G e H; 3I; 4F). Diferindo das demais, em *R. cf. hahni* as vesículas são numerosas e concentram-se na porção final da peça intermediária (Fig. 1J). A membrana plasmática, na extremidade final da peça intermediária, projeta-se formando um colarinho ou bainha ao redor do flagelo, separada deste pelo canal citoplasmático. A bainha citoplasmática mostra-se muito longa em *A. cf. albifrons* (Fig. 4J). Em *E. cf. virescens* (1), *E. cf. virescens* (2) e *R. cf. hahni*, o canal citoplasmático, formado durante a espermiogênese, permanece aberto apenas na região da bainha citoplasmática (Figs. 1G, 2E e 3F). Já em *A. cf. albifrons* o canal citoplasmático mantém-se aberto ao longo de toda a peça intermediária (Figs. 4A – C, E e F). As mitocôndrias, alongadas e ramificadas, concentram-se lateralmente, tornando a peça intermediária assimétrica (Figs. 1I e J; 2H; 3I; 4H e I). Em *R. cf. hahni*, *E. cf. virescens* (1) e (2) as mitocôndrias não estão separadas da região inicial do axonema pelo canal citoplasmático. Já em *A. cf. albifrons* as mitocôndrias estão separadas do flagelo pelo canal citoplasmático (Fig. 4I).

O flagelo contém o axonema clássico (9 + 2) e a membrana apresenta duas projeções alares, as “fins”. De tamanho médio em *E. cf. virescens* (2) (Fig. 2I), bastante longas em *E. cf. virescens* (1) e *R. cf. hahni* (Figs. 3J e 4K), e ausentes em *A. cf. albifrons* (Fig. 4K).

Discussão

Mattei (1970) sugere que, em Teleostei, a espermiogênese pode resultar em dois tipos básicos de espermatozóides: tipo I e tipo II. Esta classificação é baseada na ocorrência

ou não da rotação nuclear durante a espermiogênese. O espermatozóide, um “aquasperm”, sem acrossoma, tem uma cabeça usualmente esférica, uma peça intermediária de tamanho variável, com ou sem canal citoplasmático, e um ou dois flagelos (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). Quando a rotação nuclear ocorre o flagelo localiza-se perpendicular e medialmente ao núcleo e o espermatozóide é do tipo I. Se a rotação não ocorre, o flagelo permanece lateral ao núcleo e o espermatozóide é do tipo II. A rotação nuclear, no entanto, pode ser incompleta. Neste caso, o flagelo é excêntrico ao núcleo e o espermatozóide é do tipo intermediário entre o tipo I e II (Mattei, 1970). Nas espécies aqui analisadas, como observado para a maioria dos Ostariophysi (Jamieson, 1991; Mattei, 1991) a espermiogênese e consequentemente o espermatozóide é do tipo I. Já o fechamento do canal citoplasmático, uma característica da espermiogênese dos representantes das famílias Rhamphichthyidae e Sternopygidae, encontra-se relatado para Characiformes, nas famílias Erythrinidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001a) e Characidae (Gusmão-Pompiani, 2003). Entre os Siluriformes, o fechamento do canal citoplasmático durante a espermiogênese foi observada na família Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001b).

As características gerais dos espermatozóides são muito similares entre as famílias Rhamphichthyidae, Sternopygidae e Apterontidae, havendo apenas poucas diferenças, particularmente no gênero *Apterontus*, o qual possui maior grau de diferenciação em relação as demais famílias. As principais diferenças entre os espermatozóides dos representantes destas famílias estão na posição relativa dos centríolos, na permanência ou não do canal citoplasmático, no comprimento da bainha citoplasmática, na presença ou ausência de “fins”. O padrão de compactação da cromatina, encontrado nos representantes das famílias Rhamphichthyidae, Sternopygidae e Apterontidae, guarda estreita semelhança

com aquele observado nos espermatozóides de alguns Characiformes, como na subfamília Serrasalminae (Matos *et al.*, 1993; Cruz-Landim *et al.*, 2003), família Characidae, nos gêneros *Salminus* e *Brycon* (Romagosa *et al.*, 1999; Aires *et al.*, 2000; Zaiden, 2000; Veríssimo-Silveira *et al.*, em preparação), família Anostomidae (Amaral, 2003; Veríssimo-Silveira *et al.*, em preparação) e, aparentemente nos Citharinidae (Mattei *et al.*, 1995).

A posição relativa entre os centríolos como observada nos gêneros *Rhamphichthys* e *Eigenmannia* (centríolo proximal anterior e lateral em relação ao distal), e suas estruturas de estabilização são características bastante particulares. Entre os Characidae, este tipo de posicionamento, mas não as estruturas de estabilização, tem ocorrência registrada apenas em *Hyphessobrycon eques* (Gusmão-Pompiani, 2003). Já os centríolos dos espermatozóides do gênero *Apteronotus* (centríolo proximal anterior e medial em relação ao distal) posicionam-se de forma semelhante à maioria dos espermatozóides dos Ostariophysi (Jamieson, 1991; Mattei, 1991).

As características da peça intermediária dos espermatozóides dos Gymnotiformes estudados neste capítulo, tais como forma e quantidade de mitocôndrias, presença de vesículas e ocorrência de bainha citoplasmática, são bastante semelhantes às dos Characidae, dos gêneros *Piaractus* (Cruz-Landim *et al.*, 2003; Veríssimo-Silveira *et al.*, em preparação), *Salminus* e *Brycon* (Romagosa *et al.*, 1999; Aires *et al.*, 2000; Zaiden, 2000; Veríssimo-Silveira *et al.*, em preparação). Diferem entre si e dos Characidae supra-citados pelo fato de que nos espermatozóides dos representantes das famílias Rhamphichthyidae e Sternopygidae, o canal citoplasmático mantém-se apenas na região da bainha citoplasmática. Além disso, nos Gymnotiformes, as mitocôndrias concentram-se lateralmente tornando a peça intermediária totalmente assimétrica. São ainda

particularidades dos espermatozóides dos Gymnotiformes, a longa bainha citoplasmática presente em Apterontidae, e a grande quantidade de vesículas concentradas na extremidade final da peça intermediária em Rhamphichthyidae.

Nos Gymnotiformes aqui analisados, a membrana flagelar apresenta “fins” mais ou menos longas nos representantes das famílias Rhamphichthyidae e Sternopygidae, mas não ocorre no representante dos Apterontidae. Entre os Characiformes as projeções da membrana flagelar estão presentes nos Anostomidae (Amaral, 2003; Veríssimo-Silveira *et al.*, em preparação) e Serrasalminae (Matos *et al.*, 1993; Cruz-Landim *et al.*, 2003; Gusmão-Pompiani *et al.*, em preparação), mas não ocorrem nos Characidae dos gêneros *Salminus* e *Brycon* (Romagosa *et al.*, 1999; Aires *et al.*, 2000; Zaiden, 2000; Veríssimo-Silveira *et al.*, em preparação) e nem nos Citharinidae (Mattei *et al.*, 1995).

A família Apterontidae é o clado irmão da família Sternopygidae, formando a superfamília Sinusoidea. Já a família Rhamphichthyidae está mais relacionada com a Hypopomidae, formando o clado denominado de superfamília Rhamphichthyoidea, e este por sua vez, é grupo irmão da superfamília Sinusoidea. Nas análises cladísticas, com base em dados moleculares, os Gymnotiformes surgem como mais relacionados com os Characiformes do que com os Siluriformes (Dimmick & Larson, 1996; Ortí, 1997).

As várias características ultraestruturais compartilhadas pelos espermatozóides dos representantes dos Gymnotiformes aqui analisados e por representantes de algumas famílias e subfamílias de Characiformes cujos espermatozóides são conhecidos, sugerem que os Gymnotiformes sejam mais relacionados aos Characiformes do que com os Siluriformes.

Referências Bibliográficas

- Aires, E. D., Stefanini, M. A. & Orsi, A. M. (2000). Características ultraestruturais e diferenciativas das espermatídes de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermiogênese. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **37**, 183-188.
- Albert, J. S. & Crampton, W. G. R. (2005). Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In *Electroreception* (Bullock, T. E., Hopkins, C. D., Popper, A. N. & Fay, F. R., eds.), pp. 306-403. Ithaca: Cornell University Press.
- Alves-Gomes, J. A., Ortí, G., Haygood, M. & Heiligenberg, W. (1995). Phylogenetics analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and evolution of their system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* **12**, 298-318.
- Amaral, A. A. (2003). Aspectos ultraestruturais da espermatogênese do piaçu *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britisk, 1988 (Teleostei, Characiformes, Anostomidae). Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Cruz-Landim, C., Abdalla, F. C. & Cruz-Hofling, M. A. (2003). Morphological study of the spermatogenesis in the teleost *Piaractus mesopotamicus*. *Biocell* **27**, 319-328.
- Dimmick, W. W. & Larson, A. (1996). A molecular and morphological perspective on the phylogenetic relationships of the Otophysan fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**, 120-133.
- Fink, S. V. & Fink, W. L. (1981). Interrelationships of the Ostariophysian fishes (Teleostei). *Zoology Journal Linnean Society* **72**, 297-353.

- Fink, S. V. & Fink, W. L. (1996). Interrelationships of Ostariophysan fishes. In *Interrelationships of Fishes* (Stiassny, M.L.J., Parenti, L.R. & Johnson, G.D., eds.), pp. 209-249. San Diego: Academic press.
- Gayet, M., Meunier, F. J. & Kirschbaum, F. (1994). *Ellisella kirschbaumi* Gayet & Meunier, 1991, gymnotiforme fossile de Bolivie et ses relations phylogenetiques au sein des formes actuelles. *Cybium* **18**, 273-306.
- Gusmão-Pompiani, P. (2003). Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de peixes da Ordem Characiformes, Família Characidae (Teleostei, Ostariophysi) uma abordagem filogenética. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Jamieson, B. G. M. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lavoué, S., Miya, M., Inoue, J. G., Saitoh, K., Ishiguro, N. B. & Nishida, M. (2005). Molecular systematics of the gonorynchiform fishes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences: Implications for higher-level relationships within the Otocephala. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**, 165-177.
- Mago-Leccia, F. (1994) *Electric Fishes of the Continental Waters of America*. Venezuela: FUDECI.
- Matos, E., Matos, P., Oliveira, E. & Azevedo, C. (1993). Ultraestrutura do espermatozóide do pacu, *Metynnis maculatus* Kner, 1860 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. *Revista Brasileira de Ciências Morfológicas* **10**, 7-10.
- Mattei, X. (1970). Spermiogénese comparé des poisson. In *Comparative Spermatology* (Baccetti, B., ed.), pp. 57-72. New York: Academic Press.

- Mattei, X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 3038-3055.
- Mattei, X., Marchand, B. & Thiaw, O. T. (1995). Unusual midpiece in the spermatozoon of the teleost fish, *Citharinus* sp.. *Journal of Submicroscopy, Cytology and Pathology* **27**, 89-191.
- Ortí, G. (1997). Radiation of Characiform Fishes: Evidences from Mitochondrial and Nuclear DNA sequences. In *Molecular Systematics of Fishes* (Kocher, T. D. & Stepien, C. A., eds.), pp. 219-243. San Diego: Academic Press.
- Quagio-Grassiotto, I., Negrão, J. N. C., Carvalho, E. D. & Foresti, F. (2001a). Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *Journal of Fish Biology* **59**, 1494-1502.
- Quagio-Grassiotto, I., Oliveira, C. & Gosztonyi A. E. (2001b). The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. *Journal of Fish Biology* **58**, 1623-1632.
- Roberts, T. (1973). Interrelationships of ostariophysian. In *Interrelationships of fishes* (Greenwood, P. H., Miles, R. S. & Patterson, C., eds.), pp. 373-395. San Diego: Academic Press.
- Romagosa, E., Narahara, M. Y., Borella, M. I., Parreira, S. F. & Fenerich-Verani, N. (1999). Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *B. cephalus* (Teleostei, Characidae). *Tissue and Cell* **31**, 540-544.
- Rosen, D. E. & Greenwood, P. H. (1970). Origin of the Weberian apparatus and the relationships of the ostariophysian and gonorynchiform fishes. *American Museum Novitates* **2428**, 1-25.

- Triques, M. L. (1993). Filogenia dos gêneros de Gymnotiformes (Actinopterygii, Ostariophysi), com base em caracteres esqueléticos. *Comunicações do Museu de Ciências* **6**, 85-130.
- Zaiden, S. F. (2000). Morfologia gonadal e metabolismo energético da piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes) (Pisces, Characidae) em cativeiro, durante o ciclo reprodutivo anual. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Legenda Figuras:

Figura 1: Espermiogênese e espermatozóide de *Rhamphichthys cf. hahni*. **Fig. A** – Espermátide inicial, 13800x; **Figs. B a D** – Espermátides em cortes longitudinais, 17000x, 21000x, 25200x, respectivamente; **Fig. E** – Peça intermediária da espermátide, 13800x; **Fig. F** – Corte transversal do flagelo da espermátide, 29400x; **Figs. G e H** – Espermatozóides, 25900x, 25200x, respectivamente; **Fig. I e J** – Peça intermediária, 40200x, 27200x, respectivamente; **Fig. K** – Corte transversal do flagelo, 31500x.

Figura 2: Espermiogênese e espermatozóide de *Eigenmannia cf. virescens* (2). **Fig. A** – Espermátide inicial, 13250x; **Figs. B e C** – Espermátides em cortes longitudinais, 17000x, 27200x, respectivamente; **Fig. D** – Corte transversal do flagelo da espermátide, 23000x; **Fig. E a G** – Espermatozóides, 17000x, 57500x, 16100x, respectivamente; **Fig. H** – Peça intermediária, 34500x; **Fig. I** – Corte transversal do flagelo, 31500x.

Figura 3: Espermiogênese e espermatozóide de *Eigenmannia cf. virescens* (1). **Fig. A** – Espermátide inicial, 10600x; **Figs. B e C** – Espermátides em cortes longitudinais, 12200x, 11500x, respectivamente; **Fig. D** – Peça intermediária da espermátide, 8500x; **Fig. E** – Espermátide final, 16100x; **Figs. F a H** – Espermatozóides, 13600x, 22050x, 34500x, respectivamente; **Fig. I** – Peça intermediária, 18900x; **Fig. J** – Corte transversal do flagelo, 18900x; **Fig. K** – Espermatozóide, 18900x.

Figura 4: Espermiogênese e espermatozóide de *Apteronotus cf. albifrons*. **Fig. A** – Espermátide inicial, 19500x; **Figs. B e C** – Espermátides em cortes longitudinais, 21250x,

13800x, respectivamente; **Fig. D** – Peça intermediária da espermatíde, 11500x; **Fig. E** – Espermatíde, 13800x; **Figs. F e G** – Espermatozóides, 13800x, 31500x, respectivamente; **Figs. H e I** – Peça intermediária, 21000x, 34500x, respectivamente; **Fig. J** – Corte longitudinal do flagelo, 34500x; **Fig. K** – Corte transversal do flagelo, 18900x.

Abreviaturas

A: axonema, **B:** centríolo distal, **F:** flagelo, **M:** mitocôndrias, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **V:** vesículas, **seta dupla:** fossa nuclear, **seta branca:** estruturas de estabilização do complexo centriolar, **seta preta:** canal citoplasmático, **estrela:** fins, **cabeça de seta:** bainha.

Figura 1

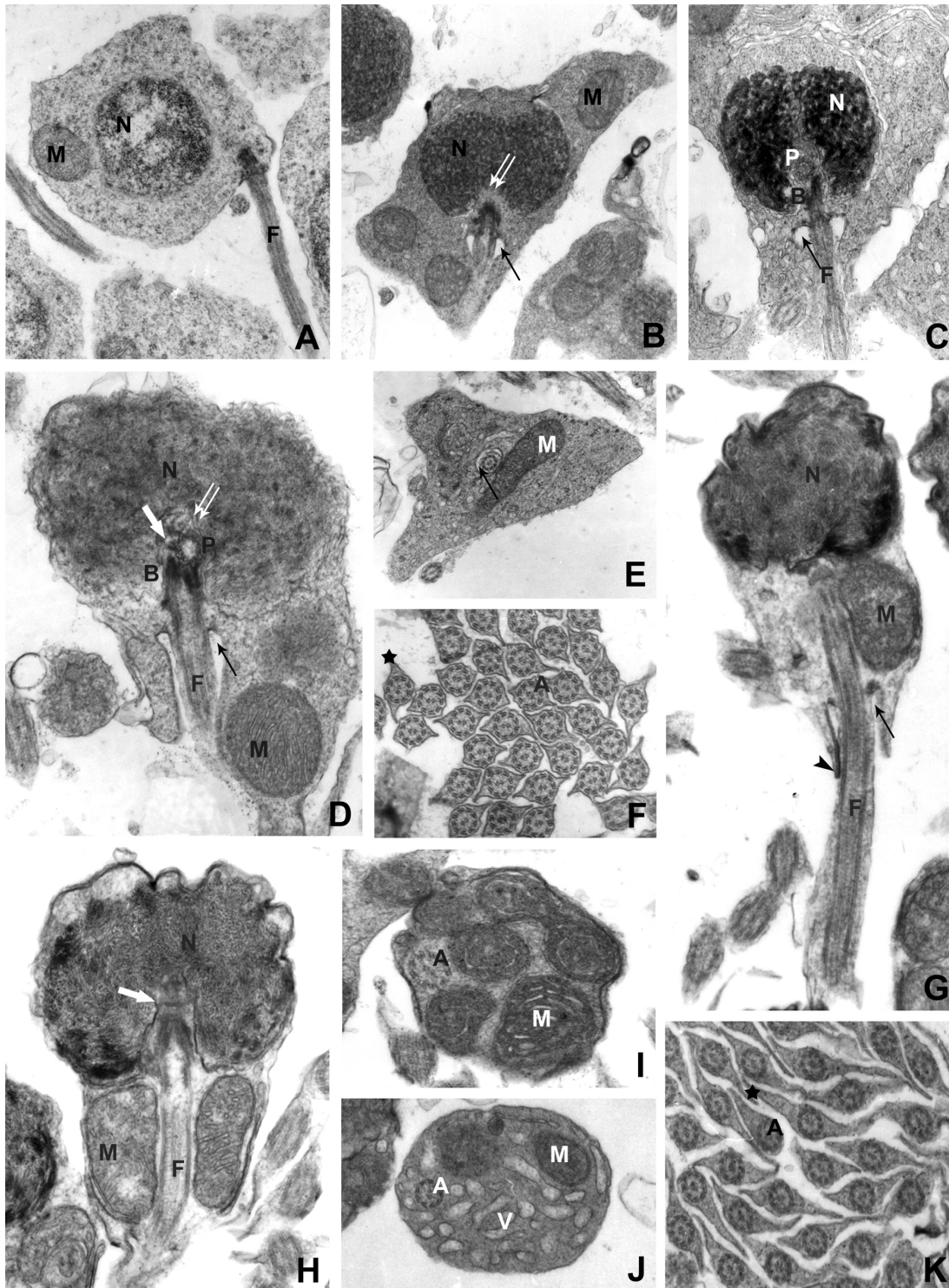


Figura 2

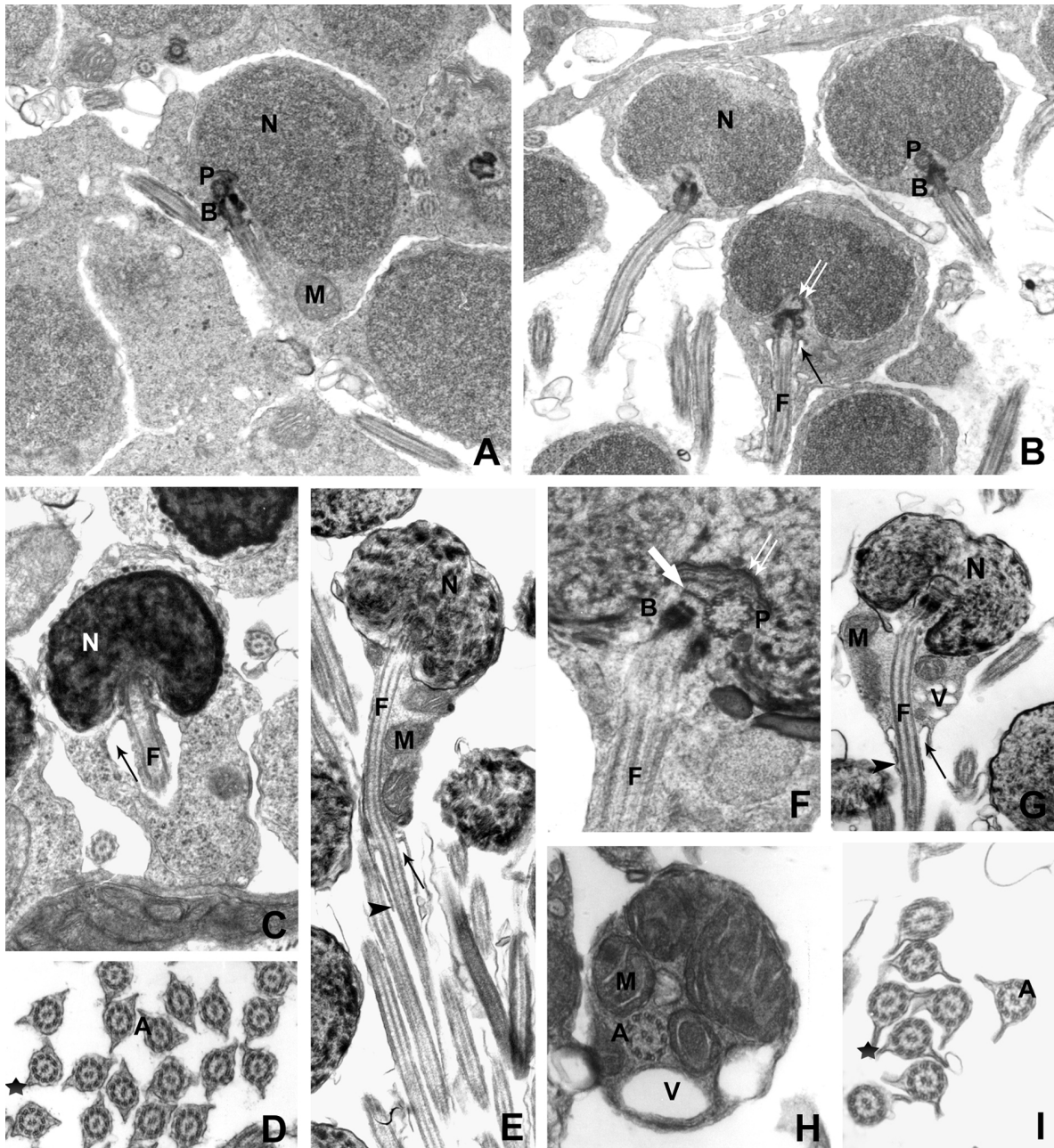


Figura 3

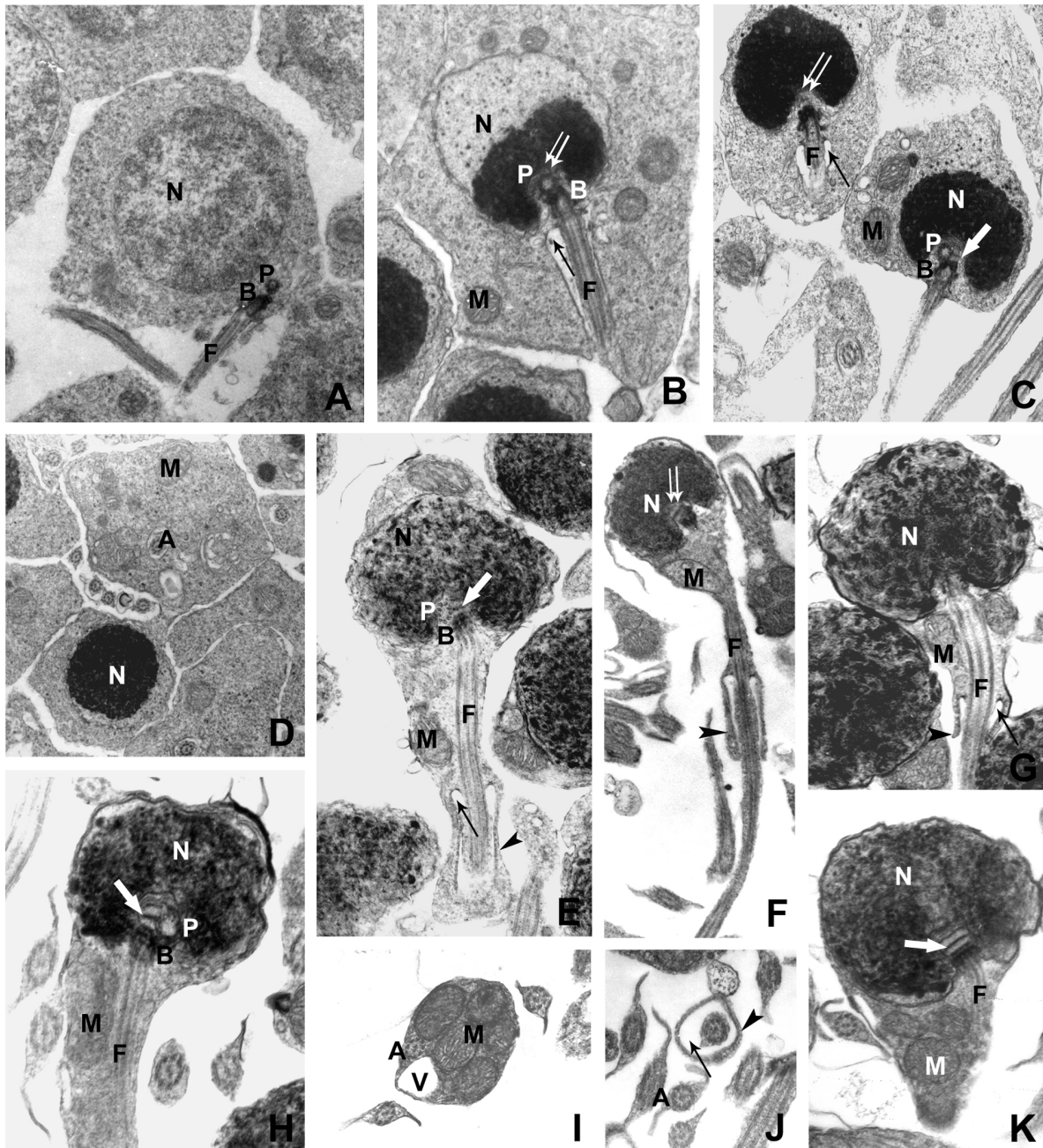
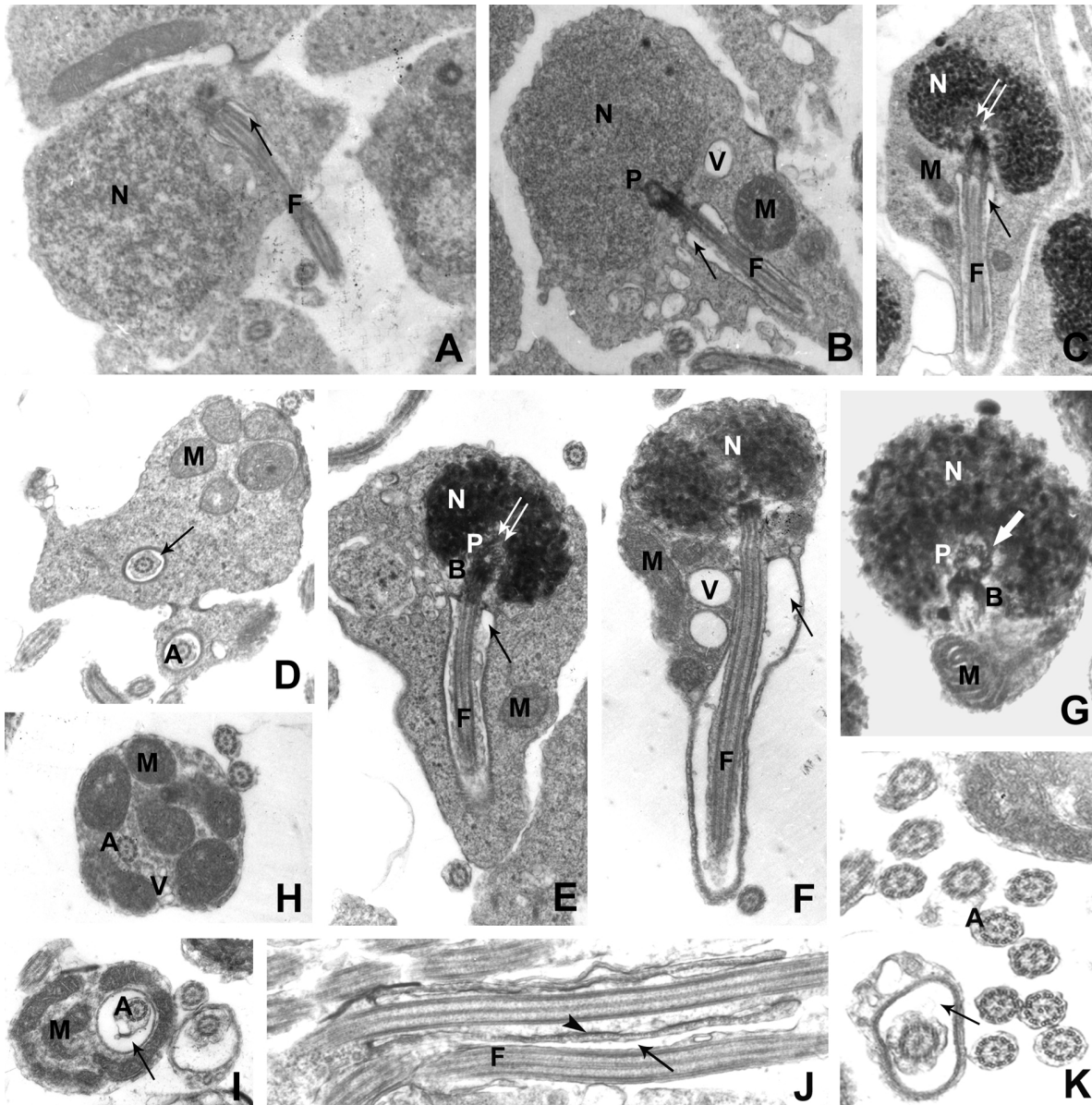


Figura 4



3.3 – Capítulo III

Análise filogenética da ordem Gymnotiformes (Teleostei, Ostariophysi) com base na ultraestrutura dos espermatozóides.

**Análise filogenética da ordem Gymnotiformes (Teleostei, Ostariophysi) com base na
ultraestrutura dos espermatozóides.**

Gisleine Fernanda França^{1,2}

Irani Quagio-Grassiotto²

Claudio Oliveira²

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, CP 6109, CEP 13.083-863.

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CP 510, CEP 18.618-000.

Autor para correspondência:

Dra. Irani Quagio-Grassiotto

Depto. de Morfologia, Instituto de Biociências,

Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

Distrito de Rubião Jr, s/n, CP 510, CEP 18.618-000.

Botucatu, SP, Brasil.

E-mail: morfologia@ibb.unesp.br

Fone/Fax: 55 14 3811-626

Resumo

Os Gymnotiformes, ordem integrante dos Ostariophysi, atualmente com 135 espécies válidas descritas, são um importante componente da ictiofauna de água doce. As relações de parentesco entre as famílias dessa ordem são ainda muito debatidas. Neste trabalho, um novo conjunto de caracteres foram utilizados para inferências filogenéticas. Dados referentes a espermiogênese e ultraestrutura dos espermatozóides foram avaliados. Para isto foram selecionados representantes das famílias de Gymnotiformes e de representantes de três outras ordens, Siluriformes, Characiformes e Cypriniformes, que estão mais relacionadas com a ordem em questão. Foram originadas três matrizes com somente um grupo externo em cada. As hipóteses filogenéticas resultantes não suportam o monofiletismo da superfamília Rhamphichthyoidea, com Rhamphichthyidae relacionando-se mais com Sternopygidae do que com Hypopomidae, com quem forma a superfamília Rhamphichthyoidea. A relação anterior reflete no monofiletismo de outra superfamília, Sinusoidea, observada como não monofilética devido à relação entre Aptereronotidae e Sternopygidae. Gymnotidae aparece como grupo irmão de Hypopomidae, formando uma politomia basal quando os dados são polarizados no representante de Cypriniformes. Nas análises com Siluriformes ou Characiformes como grupo externo, Hypopomidae aparece em uma politomia basal com os demais Gymnotiformes, e Gymnotidae como grupo irmão dos outros Gymnotiformes remanescentes. A viabilidade deste novo conjunto de caracteres pode ser maior à medida que houver um maior conjunto de dados sobre os acontecimentos da espermiogênese e estrutura dos espermatozóides para as espécies onde essas características ainda são desconhecidas.

Palavras chave: Gymnotiformes – Filogenia – ultraestrutura dos espermatozóides.

Introdução

Os Gymnotiformes são um componente importante da ictiofauna de água doce das Américas Central e do Sul. São encontrados através do neotrópico úmido em quase todos os tipos de biótipos presentes nos rios desde o sul do México até o norte da Argentina (Mago-Leccia, 1994). Esta ordem está incluída na Superordem Ostariophysi, um grupo de peixes que inclui cerca de três quartos dos peixes de água doce do mundo (Nelson, 1994). Compreendem cerca de 135 espécies válidas descritas, que se encontram distribuídas em 32 gêneros e 5 famílias (Albert & Crampton, 2005). Porém acredita-se que o número atual de Gymnotiformes é provavelmente algo entre 200 a 300 espécies (Albert & Crampton, 2005). Estas espécies formam um clado monofilético, caracterizado entre outras coisas, pela capacidade de produzir e detectar campos elétricos de diferentes intensidades.

Apesar das relações evolutivas dos Gymnotiformes estarem sustentadas por caracteres moleculares e morfológicos, as principais hipóteses de relações dentro da ordem ainda são discutidas (Triques, 1993; Gayet *et al.* 1994; Mago-Leccia, 1994; Alves-Gomes *et al.*, 1995; Albert & Crampton, 2005).

Estudos ultraestruturais dos gametas masculinos dos peixes mostram que características da estrutura dos espermatozóides e espermiogênese podem ser filogeneticamente analisados provendo importantes dados para a elucidação das relações de parentesco em vários grupos de peixes (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). Embora os estudos de Jamieson (1991) e Mattei (1991) apresentarem dados relacionados à estrutura dos espermatozóides de praticamente todos os maiores grupos de peixes vivos, os espermatozóides dos Gymnotiformes são praticamente desconhecidos, havendo apenas a

descrição ultraestrutural do espermatozóide de *Apteronotus albifrons* (= *Sternarchus albifrons*) (Jamieson, 1991).

Considerando que os padrões comuns e as variações morfológicas dos espermatozóides das diferentes espécies contêm traços filogenéticos e podem, portanto, ser úteis para a resolução das suas relações de parentesco, comparou-se os dados da ultraestrutura dos espermatozóides dos Gymnotiformes que se encontram descritos (capítulo I e II) com intuito de investigar as similaridades e diferenças entre as famílias desta ordem, baseada em filogenias descritas na literatura.

Material e Métodos

Os dados foram extraídos de descrições da espermiogênese e da ultraestrutura dos espermatozóides de representantes das famílias de Gymnotiformes: *Gymnotus cf. anguillaris* (Gymnotidae) e *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* (Hypopomidae) (Capítulo I desta tese); *Rhamphichthys cf. hahni* (Rhamphichthyidae), *Apteronotus cf. albifrons* (Apteronotidae), *Eigenmannia cf. virescens* (1) e *Eigenmannia cf. virescens* (2) (Sternopygidae) (Capítulo II desta tese). A opção pelo grupo externo foi baseada em hipóteses filogenéticas existentes na literatura. Conforme as propostas filogenéticas atualmente aceitas, as ordens Siluriformes, Characiformes e Cypriniformes, são as mais relacionadas com os Gymnotiformes.

Os dados sobre a espermiogênese e ultraestrutura dos espermatozóides, dos grupos externos, foram encontrados na literatura. Como representante da ordem Siluriformes foi utilizado *Diplomystes mesembrinus* (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001b) pertencente à família Diplomystidae, considerada a mais basal da ordem (de Pinna, 1998). Como representante

de Characiformes foi escolhido *Hoplias malabaricus* (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001a) pertencente à família Erythrinidae, considerada uma das mais basais da ordem (Calcagnotto *et al.*, 2005). O representante de Cypriniformes foi *Carassius auratus* (Bacceti, 1984), pertencente a família Cyprinidae. Os caracteres foram polarizados de acordo com o grupo externo escolhido para cada uma das três matrizes construídas.

Um total de vinte e quatro caracteres foi extraído das descrições ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides das espécies representantes de Gymnotiformes, e de representantes de Siluriformes e Characiformes.

Descrição dos caracteres

Espermiogênese

1. Rotação nuclear – presente (0), ausente (1).
2. Direção de condensação da cromatina:
 - periferia para o centro (1), uniforme em todo o núcleo (0) (*Diplomystes mesembrinus*).
 - periferia para o centro (0), uniforme em todo o núcleo (1) (*Hoplias malabaricus*).
3. Alongamento do núcleo – ausente (0), presente (1).
4. Fechamento do canal citoplasmático – ausente (2), parcial (1), total (0).
5. Formação de membranas concêntricas em torno do flagelo – ausente (1), presente (0).

Espermatozóide

6. Compactação da cromatina:
 - filamentos justapostos (1), feixes filamentosos (0) (*Diplomystes mesembrinus*).

- filamentos justapostos (0), feixes filamentosos (1) (*Carassius auratus* e *Hoplias malabaricus*).

7. Anéis membranosos concêntricos:

- ausente (0), presente (1) (*Diplomystes mesembrinus* e *Hoplias malabaricus*).

- ausente (1), presente (0) (*Carassius auratus*).

8. Posição do núcleo em relação ao flagelo – anterior e ligeiramente excêntrico (0), lateral (1).

9. Forma do núcleo – esférico (0), semi-arco (1).

10. Forma da fossa nuclear – simples arco (0), duplo arco (1).

11. Posição da fossa nuclear:

- medial (0), excêntrica (1), lateral (2) (*Diplomystes mesembrinus*).

- medial (1), excêntrica (0), lateral (2) (*Carassius auratus* e *Hoplias malabaricus*).

12. Profundidade da fossa nuclear – rasa (1), moderada (0).

(Rasa - até $\frac{1}{4}$ do diâmetro no núcleo; moderada - de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ do diâmetro do núcleo).

13. Localização do complexo centriolar em relação à fossa:

- CC fora da fossa (1), CC totalmente inserido (0) (*Diplomystes mesembrinus*).

- CC fora da fossa (2), somente o CP inserido na fossa (0), CC totalmente inserido (1) (*Carassius auratus* e *Hoplias malabaricus*).

14. Posição relativa dos centríolos:

- CP anterior e medial ao CD (0), CP anterior e levemente excêntrico ao CD (1) (*Diplomystes mesembrinus*).

- CP anterior e medial ao CD (2), CP anterior e levemente excêntrico ao CD (1), CP anterior e oblíquo ao CD (0) (*Carassius auratus* e *Hoplias malabaricus*).

(CC: complexo centriolar; CP: centríolo proximal; CD: centríolo distal).

15. Estruturas de estabilização do complexo centriolar – não evidentes (0), fibrilas em orientação radial (1), fibrilas em feixes paralelos (2).

16. Comprimento da peça intermediária – curta (0), média (1), longa (2);

(curta – Até uma vez o diâmetro do núcleo; média – de um a três vezes o diâmetro do núcleo; longa – mais que três vezes o diâmetro do núcleo).

17. Presença de canal citoplasmático na peça intermediária:

- ausente (0), presente (1) (*Diplomystes mesembrinus* e *Hoplias malabaricus*).

- ausente (1), presente (0) (*Carassius auratus*).

18. Bainha em torno do flagelo – ausente (0), presente em todo o canal citoplasmático (1), presente na região terminal do canal citoplasmático (2).

19. Comprimento da bainha – curta (0), longa (1);

(curta - até uma vez o diâmetro do núcleo; longa – maior que uma vez o diâmetro do núcleo).

20. Microtúbulos na peça intermediária – não evidentes (0), em feixes paralelos (2), irradiando por toda a peça (1).

21. Vesículas na peça intermediária:

- ausentes (0), maior parte periférica (1), por toda peça (2) (*Diplomystes mesembrinus*).

- maior parte periférica (0), por toda peça (1) (*Hoplias malabaricus*).

22. Projeções alares da membrana plasmática flagelar ou “fins”:

- ausente (1), curta (0), média (2), longa (3) (*Diplomystes mesembrinus*).

- ausente (0), média (1), longa (2) (*Carassius auratus* e *Hoplias malabaricus*).

(curta - até uma vez o diâmetro do axonema; média - de uma a duas vezes o diâmetro do axonema; longa - maior que duas vezes o diâmetro do axonema).

23. Compartimento membranoso em torno do flagelo:

- presente (1), ausente (0) (*Diplomystes mesembrinus*).
- presente (0), ausente (1) (*Carassius auratus* e *Hoplias malabaricus*).

24. Quantidade mitocôndrias – única (0), mais de uma (1) (*Diplomystes mesembrinus*).

.

Análise Filogenética

Foram usadas seis espécies, representando as cinco famílias de Gymnotiformes como táxons terminais. A análise foi realizada utilizando o programa PAUP versão 4.0 beta para Windows, utilizando o método de máxima parcimônia e busca exaustiva, e as árvores foram construídas com o algoritmo *tree bisection and reconnection* (TBR) e a opção ACCTRAN. Parte dos caracteres foram tratados como ordenados, enquanto que outros foram tratados como não ordenados, na dependência da visualização da característica no grupo externo ou ocorrência de mais de dois estados. Foi testado o grau de confiabilidade das árvores filogenéticas obtidas nas diferentes análises através da reamostragem por *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

Resultados

Com os dados obtidos foram construídas três matrizes: (1) considerando *Diplomystes mesembrinus* como grupo externo (Tabela 1); (2) considerando *Hoplias malabaricus* como grupo externo (Tabela 2); e (3) considerando *Carassius auratus* como grupo externo.

Tabela 1. Matriz de caracteres e seus respectivos estados analisados, utilizando *Diplomystes mesembrinus* como grupo externo.

Espécies	Caracteres																							
	1	2	3	4*	5	6	7	8	9	10	11*	12	13	14	15*	16*	17	18*	19*	20	21*	22*	23	24
<i>Diplomystes c.f. mesembrinus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gymnotus cf. anguillaris</i>	1	1	0	2	0	1	1	1	0	1	2	1	1	0	2	0	1	0	-	1	1	1	0	1
<i>Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus</i>	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	-	2	1	1	1	1
<i>Eigenmannia cf. virescens 1</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	2	0	0	1	3	0	1
<i>Eigenmannia cf. virescens 2</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	2	0	0	1	2	0	1
<i>Rhamphichthys cf. hahni</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	2	0	0	2	3	0	1
<i>Apteronotus cf. albifrons</i>	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1	1	0	2	1	0

Tabela 2. Matriz de caracteres e seus respectivos estados analisados, utilizando *Hoplias malabaricus* como grupo externo.

Espécies	Caracteres																							
	1	2	3	4*	5	6	7	8	9	10	11*	12	13*	14*	15*	16*	17	18*	19*	20*	21	22*	23	24
<i>Hoplias cf. malabaricus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
<i>Gymnotus cf. Anguillaris</i>	1	0	0	2	0	0	1	1	0	1	2	1	2	2	2	0	1	0	-	1	0	0	1	0
<i>Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus</i>	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	-	2	0	0	0	0
<i>Eigenmannia cf. virescens 1</i>	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	2	1	1	2	0	0	0	2	1	0
<i>Eigenmannia cf. virescens 2</i>	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	2	1	1	2	0	0	0	1	1	0
<i>Rhamphichthys cf. hahni</i>	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	2	1	1	2	0	0	0	1	2	1
<i>Apteronotus cf. albifrons</i>	0	1	0	2	0	1	1	0	0	0	1	0	1	2	1	2	1	1	1	1	0	1	0	1

Tabela 3. Matriz de caracteres e seus respectivos estados analisados, utilizando *Carassius auratus* como grupo externo.

Espécies	Caracteres																							
	1*	2*	3*	4*	5*	6	7	8	9	10	11*	12	13*	14*	15*	16*	17	18*	19	20*	21	22*	23	24
<i>Carassius cf. auratus</i>	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	0	0	0
<i>Gymnotus cf. anguillaris</i>	1	1	0	2	0	0	0	1	0	1	2	1	2	2	2	0	0	0	-	1	0	0	1	0
<i>Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus</i>	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	-	2	0	0	0	0
<i>Eigenmannia cf. virescens 1</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	0	2	0	0	0	2	1	0
<i>Eigenmannia cf. virescens 2</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	0	2	0	0	0	1	1	0
<i>Rhamphichthys cf. hahni</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	0	2	0	0	1	2	1	0
<i>Apteronotus cf. albifrons</i>	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	0	1	2	1	2	1	0	1	1	0	1	0	1

(* Caracteres tratados como não ordenados)

Discussão

O gênero *Rhamphichthys* aparece em um politomia com os representantes da família Sternopygidae. Para Albert & Crampton (2005), a família Rhamphichthyidae é grupo irmão da família Hypopomidae, que juntos formam o clado irmão dos Gymnotiformes mais derivados, Sternopygidae e Apterodontidae. No entanto, os dados da espermiogênese e da ultraestrutura dos espermatozoides não concordam com esta proposta, pois *R. cf. hahni* aparece mais relacionado com a família Sternopygidae, do que com qualquer outro gymnotiforme.

Os dados extraídos das células gaméticas masculinas também interferem na relação de parentesco do representante de Apterodontidae com as demais famílias. Considerando as hipóteses filogenéticas propostas por outros autores (Albert & Crampton, 2005), os Sternopygidae estão mais relacionados com os Apterodontidae do que aos Rhamphichthyidae. No entanto, no presente trabalho, Apterodontidae aparece como grupo irmão do clado formado por estas duas famílias.

No trabalho conduzido por Albert (2001) a monofilia da superfamília Rhamphichthyoidea, Rhamphichthyidae + Hypopomidae, é suportada por dezoito caracteres, e a monofilia de Sinusoidea, Sternopygidae + Apterodontidae, é suportada por oito caracteres. As relações entre famílias formando superfamílias propostas por Albert (2001), não aparecem nas análises realizadas a partir dos dados extraídos das células gaméticas masculinas.

Segundo Albert & Crampton (2005) Gymnotidae é considerada a família mais basal em Gymnotiformes e grupo irmão de todas as outras famílias da ordem. Na hipótese aqui proposta, Gymnotidae e Hypopomidae aparecem como grupos irmãos, e juntos

formam uma politomia basal com as demais famílias de Gymnotiformes, quando o grupo externo utilizado é um representante de Cypriniformes. Já quando o grupo externo é Siluriformes ou Characiformes, o representante de Hypopomidae aparece em uma politomia basal com as demais famílias de Gymnotiformes, enquanto Gymnotidae é grupo irmão dos Gymnotiformes remanescentes.

As análises filogenéticas também foram realizadas utilizando simultaneamente Characiformes, Siluriformes e Cypriniformes, como grupo externo. Na dependência da polarização dos dados, o grupo externo aparece dentro de Gymnotiformes, resultando em um grupo interno não monofilético.

Os caracteres obtidos a partir deste novo conjunto de dados podem, aparentemente, ser usados para elucidar as relações de parentesco entre as famílias, e até mesmo entre as ordens. Mais estudos são necessários, para que se possa entender como o processo de espermiogênese e estrutura dos espermatozóides evoluíram dentro de Teleostei, e desta forma buscar melhor compreender as relações de parentesco existentes na classe.

Referências Bibliográficas

- Albert, J. S. (2001) Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). *Miscellaneous Publications, Museum Zoology, University of Michigan* **190**, 1-127.
- Albert, J. S. & Crampton, W. G. R. (2005). Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In *Electroreception* (Bullock, T. E., Hopkins, C. D., Popper, A. N. & Fay, F. R., eds.), pp. 306-403. Ithaca: Cornell University Press.

- Alves-Gomes, J. A., Ortí, G., Haygood, M. & Heiligenberg, W. (1995). Phylogenetics analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and evolution of their system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* **12**, 298-318.
- Baccetti, B., Burrini, A. G., Callaini, G., Gilbertini, G., Mazzini, M. & Zerunian, S. (1984). Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. *Gamete Research* **10**, 373-396
- Calcagnotto D., Schaefer, S. A. & DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**, 135-153.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Gayet, M., Meunier, F. J. & Kirschbaum, F. (1994). *Ellisella kirschbaumi* Gayet & Meunier, 1991, gymnotiforme fossile de Bolivie et ses relations phylogénétiques au sein des formes actuelles. *Cybium* **18**, 273-306.
- Jamieson, B.G.M. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mago-Leccia, F. (1994). *Electric Fishes of the Continental Waters of America*. Venezuela: FUDECI.
- Mattei, X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 3038-3055.
- Nelson, J.S. (1994). *Fishes of the World* 3rd ed. New York: John Wiley and Sons.

- de Pinna, M. C. C. (1998). Phylogenetic relationship of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical overviews and synthesis of hypotheses. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S., eds.), pp. 279-330. Porto Alegre: Edipucrs.
- Quagio-Grassiotto, I., Negrão, J. N. C., Carvalho, E. D. & Foresti, F. (2001a). Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *Journal of Fish Biology* **59**, 1494-1502.
- Quagio-Grassiotto, I., Oliveira, C. & Gosztonyi A. E. (2001b). The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. *Journal of Fish Biology* **58**, 1623-1632.
- Triques, M. L. (1993). Filogenia dos gêneros de Gymnotiformes (Actinopterygii, Ostariophysi), com base em caracteres esqueléticos. *Comunicações do Museu de Ciências* **6**, 85-130.

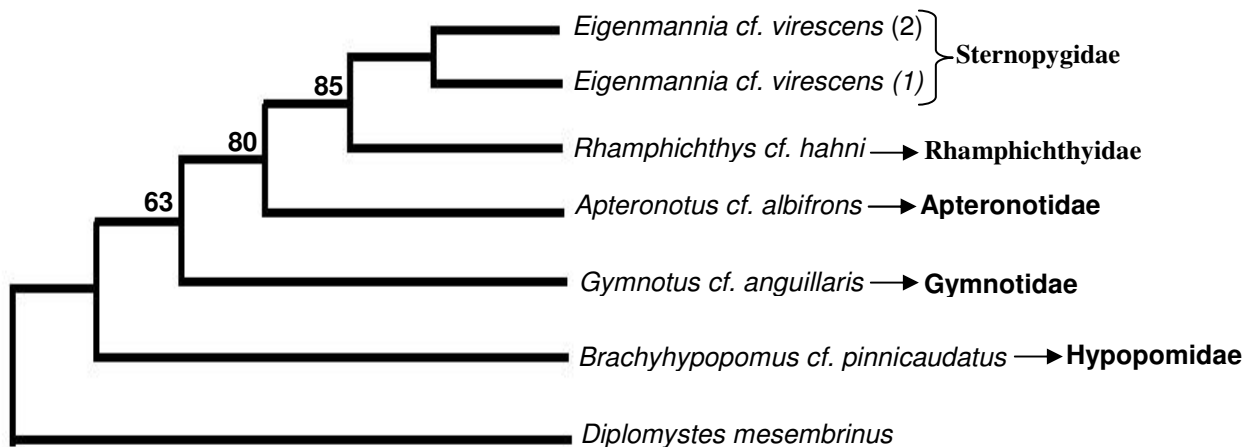


Figura 1: Cladograma das relações entre os gêneros de Gymnotiformes, utilizado *Diplomystes mesembrinus* como grupo externo. Os números indicam os valores de Bootstrap.

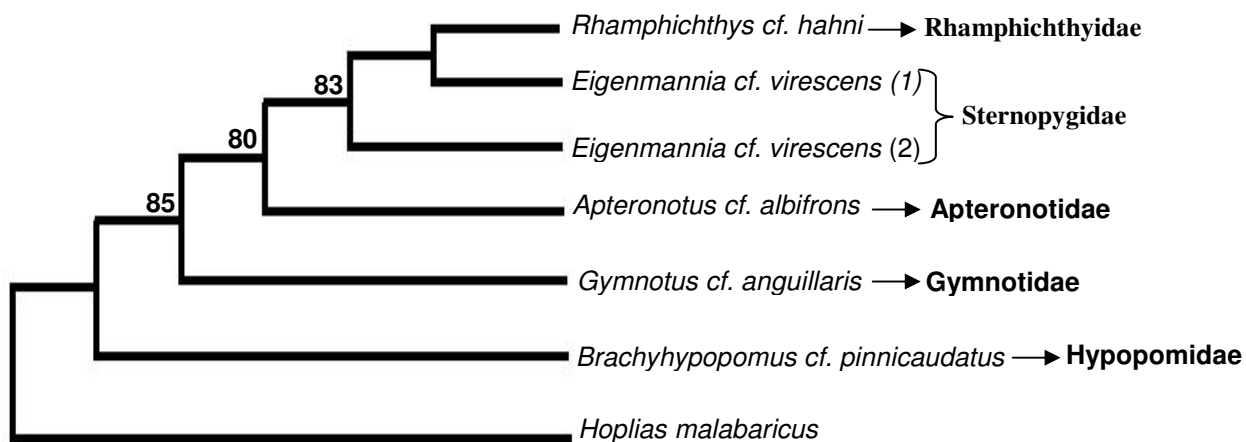


Figura 2: Cladograma das relações entre os gêneros de Gymnotiformes, utilizado *Hoplias malabaricus* como grupo externo. Os números indicam os valores de Bootstrap.

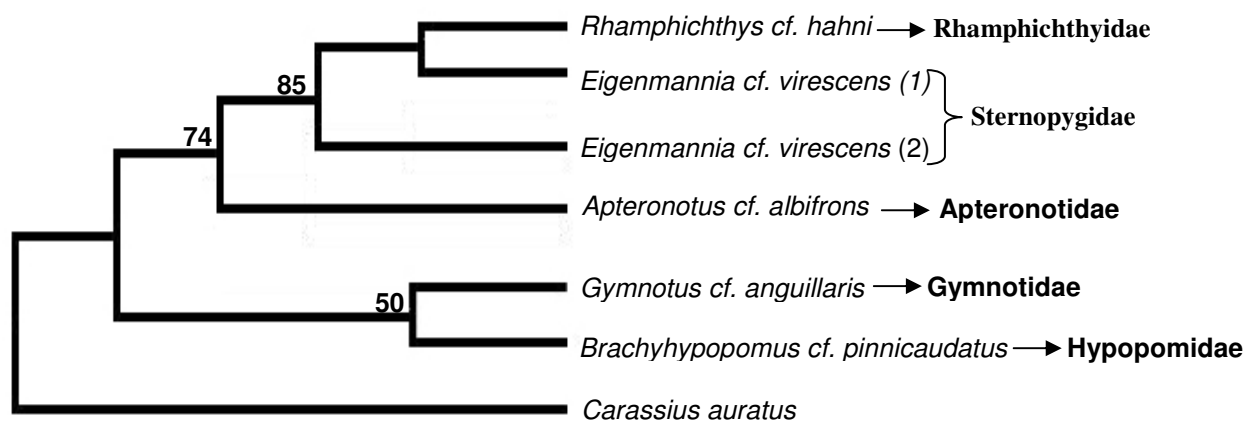


Figura 3: Cladograma das relações entre os gêneros de Gymnotiformes, utilizando *Carassius auratus* como grupo externo. Os números indicam os valores de Bootstrap.

4 – Considerações finais

A ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides revelaram uma grande diversidade de morfologia e forma dos espermatozóides dentro da Ordem Gymnotiformes. No grupo em questão, puderam ser visualizados dois tipos de espermiogênese, tipo I e tipo II (sensu Mattei, 1970). A espermiogênese do tipo II foi encontrada somente no representante da família Gymnotidae, considerada a mais basal dentro da ordem (Albert & Crampton, 2005). Outras características também foram exclusivas para *Gymnotus cf. anguillaris* comparando-o com os outros espermatozóides estudados da mesma ordem.

Os demais espermatozóides são do tipo I. As características observadas na espermiogênese e nos espermatozóides de *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus* representante de Hypopomidae, mostram algumas particularidades em relação às outras espécies estudadas. Apesar de compartilhar a ocorrência de rotação nuclear com os representantes das outras famílias, exceto por *Gymnotus cf. anguillaris*, o espermatozóide formado é muito peculiar, devido ao alongamento do núcleo em sentido posterior. Fato este que ocasiona outras mudanças posicionais, tais como, da fossa nuclear em relação ao núcleo, posição relativa entre os centríolos e do flagelo em relação ao núcleo. Entretanto, pode-se especular que caso não houvesse a rotação nuclear, o espermatozóide formado poderia compartilhar mais características com o do representante de Gymnotidae.

Agrupado juntamente com a família Hypopomidae, os Rhamphichthyidae, formam a superfamília Rhamphichthyoidea, cuja monofilia é sustentada por 18 caracteres morfológicos (Albert, 2001). No entanto quando se compara a ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides, as famílias mostram-se muito distintas.

Compartilham somente características como ocorrência de rotação nuclear, grande quantidade de vesículas e posição relativa dos centríolos, embora nesta última os acontecimentos não coincidirem para a posição final dos centríolos. Em *Brachyhypopomus cf. pinnicaudatus*, os centríolos assumem tal posição relativa um ao outro devido ao movimento do núcleo em sentido posterior, que acaba por arrastar o centríolo proximal deslocando-o da posição inicialmente medial em relação ao corpúsculo basal. Em Rhamphichthyidae, o centríolo proximal parece ser deslocado ligeiramente da posição medial devido ao aparecimento de fibrilas de estabilização, que ancoram o corpúsculo basal diretamente a membrana nuclear do teto da fossa. Assim a superfamília Rhamphichthyoidea não teve sua monofilia sustentada, nas hipóteses filogenéticas apresentadas no presente estudo.

A família Rhamphichthyidae pode não aparecer mais relacionada com a Hypopomidae, no entanto relacionou-se de forma mais estreita com o clado formado pela família Sternopygidae, com quem possui muitas características da espermiogênese e estrutura dos espermatozóides em comum. Apenas alguns acontecimentos diferiram das outras espécies mais aparentadas, tais como, quantidade de vesículas e comprimento das “fins”.

Apteronotidae compartilhou muitas características com Sternopygidae e Rhamphichthyidae, apresentando apenas pequenas particularidades, as quais foram decisivas na determinação da relação de parentesco desta com as duas outras famílias. Quando observamos a hipótese filogenética proposta por Albert & Crampton (2005), as famílias Apteronotidae e Sternopygidae formam a superfamília Sinusoidea, que é tida como monofilética. A hipótese obtida pelos dados da espermiogênese e estrutura dos

espermatozóides mostra Sternopygidae menos relacionado com Apterontidae se comparado a Rhamphichthyidae. Tal relação pode ser atribuída pelo não compartilhamento de características como, tipo de canal citoplasmático formado, comprimento da bainha e “fins”, com *Eigenmannia cf. virescens* (1), *Eigenmannia cf. virescens* (2) e *Rhamphichthys cf. hahni*.

No que diz respeito à relação das ordens dentro de Ostariophysi, foi notável a quantidade de características similares entre os Gymnotiformes e Characiformes, sugerindo que possivelmente estas duas ordens estão mais relacionadas, porém é necessário a realização de outras análises filogenéticas para testar essa hipótese.

As características observadas na ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides permitiram a extração de dados passíveis de uso em análise filogenética. Porém são necessários estudos adicionais, a fim de aumentar o número de táxons terminais, e conseqüentemente a quantidade e qualidade destes dados, os quais também serão úteis no melhor entendimento sobre o processo de evolução que envolve os diversos tipos de espermiogênese e espermatozóides.

5 – Referências Bibliográficas

- Aires, E. D., Stefanini, M. A., Orsi, A. M. (2000). Características ultraestruturais e diferenciativas das espermatídes de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermiogênese. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **37**, 183-188.
- Albert, J. S. & Campos-da-Paz, R. (1998). Phylogenetic systematics of Gymnotiformes with diagnoses of 38 clades: a review of the available data. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L., Reis, R. E., Vari, R. P., de Lucena, C. A. S. & de Lucena, Z. M. S., eds), pp. 419-446. Porto Alegre: Edipucrs.
- Albert, J. S. (2001). Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). Miscellaneous Publications, Museum Zoology, University of Michigan **190**, 1-127.
- Albert, J. S. & Crampton, W. G. R. (2005). Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In *Electroreception* (Bullock, T. E., Hopkins, C. D., Popper, A. N. & Fay, F. R., eds.), pp. 306-403. Ithaca: Cornell University Press.
- Alves-Gomes, J. A., Ortí, G., Haygood, M. & Heiligenberg, W. (1995). Phylogenetics analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and evolution of their system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* **12**, 298-318.
- Amanze, D. & Iyengar, A. (1990). The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. *Development* **109**, 495-500.

- Andrade R. F., Bazzoli N., Rizzo E. & Sato Y. (2001). Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tissue & Cell* **33**, 524-532.
- Baccetti, B., Burrini, A. G., Callaini, G., Gilbertini, G., Mazzini, M. & Zerunian, S. (1984). Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. *Gamete Research* **10**, 373-396.
- Burns, J. R., Meisner A. D., Weitzman, S. H. & Malabarba, L. R. (1998). Sperm and spermatocyte ultrastructure in the inseminating catfish, *Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysi: Siluriformes, Auchenipteridae). *Copeia* **1**, 173-179.
- Burns, J. R., Weitzman, S. H., Lange, K. R. & Malabarba, L. R. (1998). Sperm ultrastructure in characid fishes (Teleostei, Ostariophysi). In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S., eds.), pp.235-244. Porto Alegre: Edipucrs.
- Campos-da-Paz, R. & Albert, J. S. (1998). The gymnotiform 'eels' of tropical America: a history of classification and phylogenetic studies of South American electric knifefishes (Teleostei, Ostariophysi). In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L., Reis, R. E., Vari, R. P., de Lucena, C. A. S. & de Lucena, Z. M. S., eds.), pp. 401-417. Porto Alegre: Edipucrs.
- Dimmick, W. W. & Larson, A. (1996). A molecular and morphological perspective on the phylogenetic relationships of the Otophysan fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**, 120-133.
- Fink, S. V. & Fink, W. L. (1981). Interrelationships of the Ostariophysian fishes (Teleostei). *Zoology Journal Linnean Society* **72**, 297-353.

- Fink, S. V. & Fink, W. L. (1996). Interrelationships of Ostariophysan fishes. In *Interrelationships of Fishes* (Stiassny, M.L.J., Parenti, L.R. & Johnson, G.D., eds.), pp. 209-249. San Diego: Academic press.
- Franzèn, A. (1970). Phylogenetic aspects of the morfology of spermatozoa and spermiogenesis. In *Comparative spermatology* (Baccetti, B., ed.), pp. 29-45. New York: Academic Press.
- Futuyma, D. J. (1992). *Biologia Evolutiva*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq.
- Gayet, M., Meunier, F. J. & Kirschbaum, F. (1994). *Ellisella kirschbaumi* Gayet & Meunier, 1991, gymnotiforme fossile de Bolivie et ses relations phylogénétiques au sein des formes actuelles. *Cybium* **18**, 273-306.
- Gusmão-Pompiani, P. (2003). Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de peixes da Ordem Characiformes, Família Characidae (Teleostei, Ostariophysi) uma abordagem filogenética. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetics systematics*. Illinois: University of Illionois Press.
- Jamieson, B. G. M. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lauder, G. V. & Liem, K. F. (1983). The evolution and interrelationships of the Actinopterygian fishes. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* **150**, 95-197.
- Lavoué, S., Miya, M., Inoue, J. G., Saitoh, K., Ishiguro, N. B. & Nishida, M. (2005). Molecular systematics of the gonorynchiform fishes (Teleostei) based on whole

- mitogenome sequences: Implications for higher-level relationships within the Otocephala. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**, 165-177.
- Magalhães, A. L. B. de (1998). Gametogenesis e reprodução de *Galeocharax knerii* (Steindachner, 1879) (Pisces, Characidae) nos reservatórios de Furnas e Itumbiara: estudo biométrico, histológico e ultra-estrutural. Tese de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Mago-Leccia, F. (1994). *Electric Fishes of the Continental Waters of America*. Venezuela: FUDECI.
- Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, C. A. S. & Lucena, Z. M. S. (eds.). (1998). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: Edipucrs.
- Matos, E., Matos, P., Oliveira, E. & Azevedo, C. (1993). Ultraestrutura do espermatozóide do pacu, *Metynnis maculatus* Kner, 1860 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. *Revista Brasileira de Ciências Morfológicas* **10**, 7-10.
- Matos, E., Matos, P., Santos M. N. S. & Azevedo, C. (1998). Aspectos morfológicos e ultraestruturais do espermatozóide de *Curimata inornata* Vari, 1989 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. *Acta Amazônica* **28**, 449-453.
- Matos, E., Matos, P., Corral, L. & Azevedo, C. (2000). Estrutura fina do espermatozóide de *Acestrorhyncus falcatus* Bloch (Teleostei, Characidae) da região norte do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **17**, 747-752.
- Mattei, X. (1970). Spermiogénese comparé des poisson. In *Comparative Spermatology* (Baccetti, B., ed.), pp. 57-72. New York: Academic Press.

- Mattei, X. (1988). The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. *Biology of the Cell* **63**, 151-158.
- Mattei, X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 3038-3055.
- Nelson, J.S. (1994). *Fishes of the World* 3rd ed. New York: John Wiley and Sons.
- Ortí, G. (1997). Radiation of Characiform Fishes: Evidences from Mitochondrial and Nuclear DNA sequences. In *Molecular Systematics of Fishes* (Kocher, T. D. & Stepien, C. A., eds.), pp.219-243. San Diego: Academic Press.
- Pecio, A & Rafinski, J. (1999). Spermiogenesis in *Mimagoniates barberi* (Teleostei, Ostariophysi, Characidae), an oviparous, internally fertilizing fish. *Acta Zoologica* **80**, 35-45.
- Quagio-Grassiotto, I. & Carvalho, E. D. (2000). Ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermiogenesis. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology* **32**, 629-633.
- Quagio-Grassiotto, I., Negrão, J. N. C., Carvalho, E. D. & Foresti, F. (2001a). Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *Journal of Fish Biology* **59**, 1494-1502.
- Quagio-Grassiotto, I., Oliveira, C. & Gosztonyi A. E. (2001b). The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. *Journal of Fish Biology* **58**, 1623-1632.
- Quagio-Grassiotto, I., Gameiro, M. C., Schneider, T., Malabarba, L. R. & Oliveira, C. (2003). Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of Curimatidae

- with some consideration on Characiformes spermatozoal ultrastructure. *Neotropical Ichthyology* **1**, 35-45.
- Quagio-Grassiotto, I., Spadella, M. A., Carvalho, M., & Oliveira, C. (2005). Comparative description and discussion of spermiogenesis and spermatozoal ultrastructure in some species of Heptapteridae and Pseudopimelodidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical ichthyology* **3**, 401-410.
- Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, C. J. Jr. (2003). *Checklist of freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs.
- Roberts, T. (1973). Interrelationships of ostariophysian. In *Interrelationships of fishes* (Greenwood, P. H., Miles, R. S. & Patterson, C., eds.), pp. 373-395. San Diego: Academic Press.
- Romagosa, E., Narahara, M. Y., Borella, M. I., Parreira, S. F. & Fenerich-Verani, N. (1999). Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *B. cephalus* (Teleostei, Characidae). *Tissue and Cell* **31**, 540-544.
- Rosen, D. E. & Greenwood, P. H. (1970). Origin of the Weberian apparatus and the relationships of the ostariophysian and gonorynchiform fishes. *American Museum Novitates* **2428**, 1-25.
- Santos, J. E., Bazzoli, N., Rizzo, E. & Santos G. B. (2001). Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lutken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue and Cell* **33**, 533-540.
- Savage, J. M. (1995). Systematics and the biodiversity crisis. *BioScience* **45**, 673-679.

- Schaefer, S. A. (1998). Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetics studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L., Reis, R. E., Vari, R. P., de Lucena, C. A. S. & de Lucena, Z. M. S., eds.), pp. 375-400. Porto Alegre: Edipucrs.
- Triques, M. L. (1993). Filogenia dos gêneros de Gymnotiformes (Actinopterygii, Ostariophysi), com base em caracteres esqueléticos. *Comunicações do Museu de Ciências* **6**, 85-130.
- Vari, R. P. & Malabarba L. R. (1998). Neotropical Ichthyology: An Overview. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L., Reis, R. E., Vari, R. P., de Lucena, C. A. S. & de Lucena, Z. M. S., eds.), pp. 1-11. Porto Alegre: Edipucrs.
- Veríssimo-Silveira, R. (2003). Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do dourado *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1849). Tese de Mestrado. Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Zaiden, S. F. (2000). Morfologia gonadal e metabolismo energético da piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes) (Pisces, Characidae) em cativeiro, durante o ciclo reprodutivo anual. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.