

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Rafael Henrique Nóbrega

“ALTERAÇÕES DO EPITÉLIO GERMINATIVO
MASCULINO, CÉLULAS ENDÓCRINAS
TESTICULARES E CÉLULAS GONADOTRÓPICAS
DURANTE O CICLO REPRODUTIVO DE *Serrasalmus
spilopleura* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus*
(Lacépède, 1803)”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Rafael Henrique
Nóbrega
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

Campinas, 2006

BIBLIOTECA CENTR
DESENVOLVIMENT
COLEÇÃO
UNICAMP

UNIDADE BC
 Nº CHAMADA T1 UNICAMP
N669a
 V EX
 TOMBO BCI 70006
 PROC. 16.123.06
 C ☐ D ☒
 PREÇO 14.00
 DATA 14.9.06

BIB ID: 386718

ii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

N669a Nóbrega, Rafael Henrique
 Alterações do epitélio germinativo masculino, células
 endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante
 o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus spilopleura* (Kner,
 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) / Rafael
 Henrique Nóbrega. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Irani Quagio-Grassiotto.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ciclo reprodutivo. 2. Espermatogênese. 3.
 Endocrinologia. I. Quagio-Grassiotto, Irani. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Changes in the male germinal epithelium, testicular endocrine cells and
 gonadotropic cells during the reproductive cycle of *Serrasalmus spilopleura* (Kner, 1859)
 and *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803).

Palavras-chave em inglês: Reproductive cycle; Spermatogenesis; Endocrinology.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

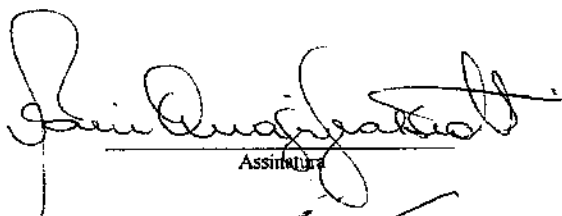
Banca examinadora: Irani Quagio-Grassiotto, Luiz Renato de França, Sebastião Roberto
 Taboga.

Data da defesa: 19/06/2006.

Campinas, 19 de junho de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Irani Quagio Grassiotto (Orientadora)



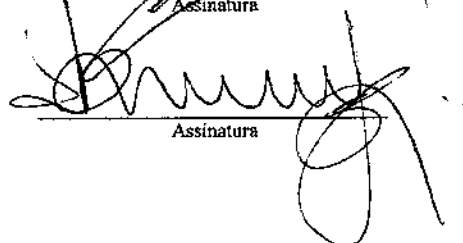
Assinatura

Prof. Dr. Luiz Renato de França



Assinatura

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga



Assinatura

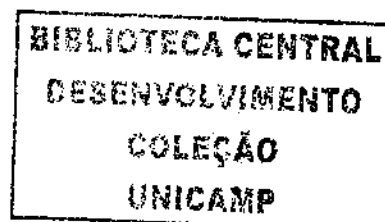
Profa. Dra. Estela Sasso Cerri

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luís Felisbino

Assinatura

11.06.2006 984



*“A mais bela experiência que podemos ter é a do mistério.
É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e
ciência. Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com
ela está praticamente morto e seus olhos estão ofuscados”*

Albert Einstein

Agradecimentos

- À Dra. Irani Quagio-Grassiotto pela orientação, dedicação e ensinamentos durante esses 6 anos de convivência. A concretização desse trabalho deve-se ao seu empenho, e sem dúvida nenhuma, por ter acreditado e investido em mim. O trabalho termina, mas a amizade e admiração são eternas...
- À Dra. Maria Inês Borella pela orientação, paciência e amizade. Agradeço pela oportunidade de subir um degrau no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e por fazer a hora do café um momento bastante divertido!!
- Aos membros que compuseram a banca Examinadora, Prof. Dr. Luiz Renato de França e Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por terem aceitado o convite, pela disponibilidade, correção e sugestões na análise desse trabalho.
- Aos Professores, Dra. Estela Sasso-Cerri e Dr. Hélio Chiarini-Garcia, pela disponibilidade e sugestões na análise prévia desse trabalho.
- Aos Professores, Dra. Fabiana Lo Nostro e Dr. Harry J. Grier, pelos incentivos, sugestões, amizade e mais, por acreditarem e apoiarem o epitélio germinativo dos peixes!!
- Aos Professores, Dra. Denise Vizziano e Dr. Gustavo Somoza, pelas idéias e por me iniciarem no campo da endocrinologia dos peixes.
- À Profa. Dra. Maeli Dal Pae pelos ensinamentos, amizade e acessibilidade ao laboratório para as análises histo-enzimáticas.
- Aos Professores do Depto. de Morfologia/IBB-UNESP (Botucatu), em especial, à Dra. Maria Dalva Cesario, Dra. Cláudia Helena Pellizzon e Dra. Daniela Carvalho dos Santos, pelos ensinamentos, conselhos e amizade eterna.
- Aos professores do Depto de Biologia Celular/IB-UNICAMP pela oportunidade de aprendizado e por me mostrarem o quão belo e intrigante é a Biologia das Células.
- Aos professores do Depto. de Biologia Celular e do Desenvolvimento/ICB-USP pela oportunidade de aprendizado e acessibilidade aos laboratórios.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural/IB-UNICAMP pela oportunidade de realizar o mestrado.
- À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processos: 03/11078-9 e 04/01262-0) pelo auxílio financeiro e possibilidade de realização desse trabalho.

- Aos técnicos, que mais que técnicos são verdadeiros amigos, Sr. Antônio Vicente Salvador (IBB/UNESP), Sra. Sueli Cruz Michelin (IBB/UNESP), Sr. José Eduardo Bozano (IBB/UNESP) e Cruz Alberto Mendoza Rigonati (ICB/USP). Meu muito obrigado pelos ensinamentos, paciência, dedicação e amizade constante!!
- Ao Centro de Microscopia Eletrônica/IBB-UNESP (Botucatu) e à sua supervisora Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório, pela utilização das instalações.
- Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica/IBB-UNESP (Botucatu), Maria Helena Moreno, Maria Euleda Lino Peres, Nivalde Antônio Basso e Claudete dos Santos Tardivo, pela grande amizade e auxílio técnico prestado a esse trabalho.
- À Sra. Lilliam Alves Senne Panagio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelos serviços burocráticos prestados, imensa ajuda e amizade.
- Às Sras. Luciana Cristina Montes e Patrícia Luciane Souza Ramos, secretárias do Depto. de Morfologia/IBB-UNESP (Botucatu), pela amizade e serviços prestados.
- Aos pescadores pela disponibilidade de coleta dos peixes.
- Aos amigos do laboratório de Reprodução de Peixes Neotropicais/IBB-UNESP (Botucatu) pela convivência diária e auxílios que vão desde à ajudas na bancada até a conselhos ou risadas que me motivavam e me faziam acreditar no meu trabalho. Meu Muito Obrigado!! Foi muito bom ter trabalhado com vocês!! Os peixinhos do lab que nadam ou já nadaram nessa lagoa a quem sou eternamente grato são: Ana Paula Ferraz da Silva, Antônio Vicente Salvador, Ariene Cristina Dias Guimarães, Clarianna Martins Baicere Silva, Débora Barbosa Vendramini Costa, Fernanda Natália Antoneli, Gisleine Fernanda França, João Paulo Amorim, Kátia Kato de Almeida, Laércio dos Anjos Benjamin, Márcio de Carvalho, Maria Angélica Spadella, Maria Carolina Gameiro, Priscila Gusmão, Rinaldo José Ortiz, Rosicleire Veríssimo Silveira, Talita Sarah Mazzoni e Tatiana Schneider.
- Aos amigos do laboratório de Endocrinologia de Peixes/ICB-USP pela acolhida, ensinamentos e paciência. Foi muito prazeroso trabalhar com vocês!! Os peixinhos do lab a quem agradeço são: Cruz Alberto Mendoza Rigonati, Renata Guimarães Moreira, Renato Lamounier Barbieri, Renato Massaaki Honji, Rossana Luiza Leite Venturieri, Sergio Ricardo Batlouni, Sueli de Fátima Parreira e Tatiana Reis.
- Aos amigos de graduação, pós-graduação e do Depto. de Morfologia, em especial, ao Felipe Gustavo Ravagnani, pelos auxílios nos mais diversos assuntos e pela eterna amizade.
- À alguém especial, Mariana Fernandes Muniz de Souza.

- À minha família, meus pais, Eliane e Luiz Roberto (“gordos”), meu irmão Juliano e à minha avó...MUITO OBRIGADO por fazerem parte de minha vida!!! Essa vitória não é só minha mas também de vocês. Por todo o sacrifício, pela distância, pela dedicação, por todo amor empenhado...espero retribuir e lhes dar vários outros momentos mágicos e de orgulho como este!!

- À Deus,
TUDO POSSO NAQUELE que me fortaleces!!

Meu muito Obrigado a todos que contribuíram para esse trabalho,

Rafael Henrique Nóbrega

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
Introdução Geral	3
Capítulos/Artigos	37
Capítulo 1	
“Morfologia testicular e o epitélio germinativo durante a espermatogênese contínua de <i>Serrasalmus spilopleura</i> (Characiformes: Characidae)”.	38
“Ultra-estrutura e atividade enzimática (3 β -HSD e fosfatase ácida) das células de Leydig durante a espermatogênese contínua de <i>Serrasalmus spilopleura</i> (Characiformes: Characidae).”	87
Capítulo 2	
“Alterações histomorfométricas do epitélio germinativo, proliferação das células de Sertoli e atividade 3 β -HSD durante a espermatogênese descontínua de <i>Pimelodus maculatus</i> (Siluriformes: Pimelodidae).”	112
Capítulo 3	
“Imuno-histoquímica das células produtoras de FSH e LH durante a espermatogênese contínua de <i>Serrasalmus spilopleura</i> (Characiformes: Characidae) e descontínua de <i>Pimelodus maculatus</i> (Siluriformes: Pimelodidae).”	158
Conclusões Gerais	184

RESUMO

Nos peixes teleósteos, a unidade morfofuncional da espermatogênese é o espermatocisto ou cisto, constituído por células germinativas, em desenvolvimento sincrônico, envoltas perifericamente pelas células de Sertoli. Em função da cinética da espermatogênese e do tipo de reprodução (contínua ou sazonal), o epitélio germinativo pode se desenvolver de forma constante ou sofrer modificações cíclicas durante o ciclo reprodutivo. O presente trabalho teve como objetivo analisar, através de parâmetros histológicos, ultra-estruturais e imuno-histoquímicos, as alterações do epitélio germinativo em duas espécies de ciclos reprodutivos diferentes (*Serrasalmus spilopleura* – reprodução contínua e *Pimelodus maculatus* – reprodução sazonal) e correlacioná-las com as células esteroidogênicas e as células gonadotrópicas, no intuito de melhor compreender a fisiologia reprodutiva dos teleósteos tropicais de água doce. Em *S. spilopleura*, o epitélio germinativo organiza-se em cistos basais de espermatogônias e cistos apicais de células germinativas em desenvolvimento mais avançado. As espermatogônias basais apresentam intensa atividade proliferativa durante todo o ciclo reprodutivo. As células de Sertoli proliferam no intuito de acompanhar o crescimento dos cistos e aumentar o tamanho do testículo a cada ciclo reprodutivo. Quanto à esteroidogênese, a atividade 3β -HSD é maior na região espermatogênica do que na região relacionada à espermição. Em relação às células gonadotrópicas, as células LH são requeridas durante a espermatogênese e na espermição, enquanto que as células FSH são mais ativas na liberação dos espermatozóides e provavelmente na proliferação das células de Sertoli. Em *P. maculatus*, o epitélio germinativo passa por modificações morfofuncionais, categorizadas em quatro classes reprodutivas: regredida, maturação, maturação final e regressão. A proliferação das espermatogônias é intensa durante a maturação e depois diminui na maturação final e regressão. As células de Sertoli proliferam em maior frequência na classe regredida, o que contribui para o crescimento do testículo durante o ciclo reprodutivo. A atividade 3β -HSD é intensa na maturação e na maturação final, e depois diminui na regressão e na classe regredida. Os processos de espermatogênese e liberação de espermatozóides são dependentes de andrógenos. As células LH e FSH estão em maior quantidade durante a maturação e a maturação final, e depois diminuem na regressão e na classe regredida. A espermatogênese e a liberação dos espermatozóides são mais dependentes da atividade gonadotrópica do que os processos de proliferação espermatogonial e regressão testicular.

ABSTRACT

In teleost fish, the morphofunctional unit of the spermatogenesis is the spermatocyst or cyst, which are constituted by synchronous developmental germ cells surrounded by Sertoli cells. Depending on the spermatogenesis kinetics and the type of reproduction (continuous/non-seasonal or seasonal), the germinal epithelium may be constant or undergo cyclical changes during the reproductive cycle. The aim of the present work is to analyze, through histological, ultrastructural and immunohistochemical evaluation, the changes of the germinal epithelium in two different reproductive cycles (*Serrasalmus spilopleura* - continuous/non-seasonal reproduction and *Pimelodus maculatus* - seasonal reproduction) and to correlate them with steroidogenic cells and gonadotropic cells, for a better knowledge on the reproductive physiology of the tropical fresh water teleosts. In *S. spilopleura*, the germinal epithelium was organized in basal cysts of spermatogonia and apical cysts of more advanced developmental germ cells. The basal spermatogonia had intense proliferative activity during the whole reproductive cycle. Sertoli cells proliferation occurred in order to accompany the cyst growth and to increase the testis size during each reproductive cycle. For steroidogenic activity, 3 β -HSD was stronger in the spermatogenic area than in the area related to spermiation. In relation to gonadotropic cells, LH cells were requested during spermatogenesis and spermiation, whereas FSH cells were more active in spermatozoa liberation and probably in the Sertoli cell proliferation. In *P. maculatus*, the germinal epithelium undergoes morphological changes, classified in 4 reproductive classes: regressed, maturation, final maturation and regression. The spermatogonial proliferation was intense during maturation and decreased in final maturation and regression. Sertoli cells proliferated more in regressed class, contributing to testis growth during the reproductive cycle. The 3 β -HSD activity was strong in maturation and final maturation, and decreased in regression and in regressed class. Then, spermatogenesis processes and spermatozoa release are dependent of androgenic. LH and FSH cells were in large number during maturation and final maturation, and decreased in regression and in regressed class. In *P. maculatus*, spermatogenesis and spermatozoa release are more dependent of the gonadotropic activity than the processes such as spermatogonial proliferation and testicular regression.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Os peixes teleósteos e os aspectos gerais de sua biologia reprodutiva

Os peixes teleósteos constituem um dos grupos mais abundantes e diversificados dentre os vertebrados. São formados por aproximadamente 42 ordens, 431 famílias e 23.681 espécies, o que equivale a 96% dos peixes existentes (NELSON, 1994; PUDNEY, 1995, 1996; VAZZOLER, 1996; LE GAC & LOIR, 1999; NAKATANI et al., 2001). O sucesso do grupo é atribuído a uma série de adaptações que aperfeiçoaram sua respiração, flutuação, nutrição, e principalmente a reprodução (MOYLE & CECCH JR., 1996), caracterizada por uma das mais variadas estratégias reprodutivas (HOAR, 1969; NAGAHAMA, 1983; BORGES FILHO, 1987; REDDING & PATIÑO, 1993; PUDNEY, 1995, 1996; VAZZOLER, 1996; LE GAC & LOIR, 1999; NAKATANI et al., 2001). A liberação dos gametas para fertilização externa; o desenvolvimento de órgãos especializados para fertilização interna; as diferentes construções de ninhos; as variadas maneiras de cuidado com a prole; e a migração reprodutiva, seja nas formas de “piracema” ou naquelas acompanhadas por grandes alterações osmóticas são exemplos da complexidade reprodutiva dos teleósteos (HOAR, 1969; BORGES FILHO, 1987; LE GAC & LOIR, 1999).

Quanto à sexualidade, os peixes teleósteos são predominantemente gonocóricos (dióicos – sexos separados). O hermafroditismo e a reversão sexual (hermafroditismo simultâneo, protândria ou protoginia) ocorrem em menor frequência e são representados por algumas famílias como Serranidae, Sparidae, Labridae, Synbranchidae e outras (HOAR, 1969; REDDING & PATIÑO, 1993; LE GAC & LOIR, 1999; LO NOSTRO, 2000).

A maioria dos teleósteos possui reprodução sazonal, ou seja, a maturação das gônadas ocorre de forma gradual e resulta na liberação dos gametas (de forma total ou parcelada) somente em um determinado período do ciclo reprodutivo. Esse tipo de ciclo também pode ser denominado de descontínuo, sendo estritamente dependente das condições ambientais favoráveis (específica e variável para cada espécie) (SUNDARARAJ, 1981; BORGES FILHO, 1987). Em outros peixes, a reprodução é contínua, ou seja, a produção e a liberação dos gametas ocorrem de forma constante durante o ciclo reprodutivo

(SUNDARARAJ, 1981; BORGES FILHO, 1987). Nesses animais, entretanto, há um período em que a reprodução é mais freqüente (LAMAS & GODINHO, 1996).

A diversidade reprodutiva dos teleósteos reflete-se nas diferentes morfologias gonadais, por exemplo, no sistema reprodutor masculino (HOAR, 1969; DODD, 1972; CALLARD et al., 1978; GRIER, 1981, 1992; SUNDARARAJ, 1981; NAGAHAMA, 1983; REDDING & PATIÑO, 1993; PUDNEY, 1995, 1996).

2. Estrutura testicular

O testículo dos vertebrados é classificado em três tipos (tubular, tubular anastomosado e lobular) (Figura 1) conforme a organização do compartimento germinativo na periferia do testículo (GRIER, 1993; PARENTI & GRIER, 2004). No testículo tubular anastomosado, o compartimento germinativo é formado por alças e túbulos ramificados que se interconectam da periferia até o ducto testicular principal (Figuras 1B,E). Essa estrutura ocorre apenas nos osteichthyes basais, em que se incluem os teleósteos mais basais como os Ostariophysi (GRIER, 1993; PARENTI & GRIER, 2004). O testículo lobular é caracterizado por apresentar compartimento germinativo em formato digitiforme (com fundo cego) na periferia ventro-lateral do testículo (Figuras 1C,D,F). Ocorre nos Neoteleostei (como Atherinomorpha e Percomorpha) e nos anfíbios (GRIER, 1993; PARENTI & GRIER, 2004). Quanto à distribuição das espermatogônias, os testículos lobulares podem ser: (1) restritos, como nos Atherinomorpha, em que espermatogônias ficam confinadas na porção distal dos lóbulos (Figura 2B), ou (2) irrestritos, como nos Percomorpha e anfíbios, em que as espermatogônias estão distribuídas por toda extensão dos lóbulos (Figura 2A,C) (GRIER, 1993; GRIER & PARENTI, 2004). Nos testículos tubulares, o compartimento germinativo forma alças, que se estendem da periferia até a rete testis (Figura 1A). Esse último tipo ocorre em répteis, aves e mamíferos (GRIER, 1993; PARENTI & GRIER, 2004).

PARENTI & GRIER (2004) descrevem o testículo de várias espécies de peixes e disponibilizam esses dados, junto com os da literatura, em um banco de estruturas testiculares. Das 136 descrições, 58% correspondem à série Atherinomorpha (lobular restrito) e 23% à Percomorpha (lobular irrestrito). Os Ostariophysi, com 75% das espécies

de peixes de água doce do mundo (FINK & FINK, 1981), detêm apenas 5,8% das descrições (PARENTI & GRIER, 2004). Através das observações comparativas, PARENTI & GRIER (2004) propõem que o testículo tubular anastomosado é mais primitivo em relação à estrutura lobular, considerada como a mais derivada dentro do grupo dos peixes.

3. O compartimento germinativo e o epitélio germinativo

A despeito das diferentes morfologias, os testículos dos teleósteos, assim como dos demais vertebrados, compartilham uma série de características altamente conservadas durante a evolução (Figura 3A-F) (GRIER, 1992, 1993; LOIR et al., 1995; PUDNEY, 1996): (1) são responsáveis pela espermatogênese (formação dos espermatozóides) e pela síntese dos esteróides gonadais (esteroidogênese) (HOAR, 1969; NAGAHAMA, 1983; BORGES FILHO, 1987; REDDING & PATIÑO, 1993; PUDNEY, 1995, 1996); (2) são divididos em dois compartimentos, o germinativo e o intersticial, que estão separados por uma membrana basal (lâmina basal + fibras reticulares) (Figura 3A-F,I-K) (GRIER, 1992, 1993; GRIER & LO NOSTRO, 2000; LOIR et al., 1995; PUDNEY, 1993,1996; CALLARD, 1996; LO NOSTRO et al., 2003a); (3) o compartimento germinativo é formado por células germinativas e células de Sertoli, que da maneira como se associam, geram as diferentes unidades espermatogênicas dos cordados (pré-espermatocisto, espermatocisto, pós-espermatocisto) (Figura 3A-F) (GRIER, 1992; GRIER, 1993); (4) as funções de suporte, nutrição, fagocitose e intermediação hormonal são constantes entre as células de Sertoli dos cordados (PUDNEY, 1993; GRIER, 1993).

Recentemente, o epitélio germinativo dos peixes foi redefinido para incorporar os critérios histológicos de um tecido epitelial (GRIER, 2000, 2002; GRIER & LO NOSTRO, 2000). Além de produzir células germinativas, todo epitélio germinativo deve: (1) delimitar uma cavidade ou superfície (Figura 3G-I); (2) possuir células somáticas conectadas por complexos juncionais (junções de oclusão, adesão e desmossomos) (Figura 3G-I); (3) estar apoiado sobre uma membrana basal (Figura 3I-K) e (4) ser avascular (GRIER, 2000, 2002; GRIER & LO NOSTRO, 2000). Se alguma das características supracitadas estiver ausente, então o tecido não é considerado como um epitélio germinativo (GRIER, 2000, 2002; GRIER & LO NOSTRO, 2000).

Nos teleósteos, o epitélio germinativo masculino é constituído por espermatocistos, ou cistos, formados por células germinativas, em desenvolvimento parcialmente sincrónico, envoltas pelas células de Sertoli (Figura 3D,G-I,L) (GRIER, 1993; PUDNEY, 1993; PUDNEY, 1995). A sobrevivência das células germinativas é dependente de sua íntima associação com as células de Sertoli, que são responsáveis por criar um microambiente favorável e propício para a espermatogênese no interior dos cistos (SHULZ & MIURA, 2002). Morfofisiologicamente, o ciclo espermatogênico é constituído por seis grandes fases: (1) auto-renovação das espermatogônias tronco, responsáveis por iniciar e manter continuamente o processo espermatogênico; (2) proliferação espermatogonial, com a divisão mitótica das espermatogônias comprometidas com a espermatogênese; (3) meiose dos espermatócitos (meiose I e II), na qual o material genético é recombinado e segregado; (4) espermiogênese, em que as espermatídes passam por modificações morfológicas, que culminam na formação dos espermatozóides; (5) espermição, com a liberação dos espermatozóides para o lúmen do compartimento germinativo e (6) maturação espermática, em que o gameta, morfológicamente preparado, torna-se funcionalmente apto para fertilizar (SHULZ & MIURA, 2002; MIURA & MIURA, 2003; SHULZ, 2003; WELTZIEN et al., 2004).

Apesar de cística (Figura 3L), a espermatogênese de alguns teleósteos é semi-cística (Figura 3M), isto é, as células germinativas, ainda em meiose ou no final da segunda divisão meiótica, são liberadas dos cistos (Figura 3M). Nesse caso, a espermiogênese se completa na luz do compartimento germinativo (Figura 3M) (MATTEI et al., 1993).

4. Alterações do epitélio germinativo masculino

O ciclo reprodutivo dos teleósteos tem sido extensamente documentado através de parâmetros biométricos (como índice gonadossomático), descrições dos estágios de maturação e pelo desenvolvimento das células germinativas (RUBY & MCMILLAN, 1970; BARBIERI & BARBIERI, 1984; AGOSTINHO et al., 1987; BORGES FILHO, 1987; AZEVEDO et al., 1988; SCOTT & SUMPTER, 1989; NTIBA & JACCARINI, 1990; VAZZOLER, 1996; TELES & GODINHO, 1997; MARQUES et al., 2000; LOIR et al., 2001; MODESTO & CANÁRIO, 2003). No entanto, os mecanismos de crescimento

testicular, regressão e de renovação das células germinativas e somáticas a cada ciclo reprodutivo têm sido pouco explorados (GRIER & TAYLOR, 1998; BROWN-PETERSON et al., 2002; LO NOSTRO et al., 2003b). Além disso, com a redefinição do epitélio germinativo (GRIER, 2000, 2002; GRIER & LO NOSTRO, 2000), novas observações e reinterpretações vêm sendo realizadas sobre a fisiologia reprodutiva dos teleósteos (GRIER, 2002; LO NOSTRO et al., 2003b).

Alterações histológicas no epitélio germinativo masculino têm sido utilizadas para documentar cinco classes reprodutivas (regredida, maturação inicial, maturação intermediária, maturação final e regressão) (Figura 4) durante o ciclo reprodutivo anual dos Perciformes; *Centropomus undecimalis* (TAYLOR et al., 1998; GRIER & TAYLOR, 1998; GRIER & LO NOSTRO, 2000), *Rachycentron canadum* (BROWN-PETERSON et al., 2002), *Cynoscion nebulosus* (BROWN-PETERSON & WARREN, 2001) e dos Synbranchiformes; *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO et al., 2003b), com base na alternância entre o epitélio germinativo contínuo e descontínuo e nos estágios de desenvolvimento das células germinativas (GRIER & TAYLOR, 1987, 1998; GRIER, 1993; TAYLOR et al., 1998; LO NOSTRO, 2000; BROWN-PETERSON & WARREN, 2001; BROWN-PETERSON et al., 2002; LO NOSTRO et al., 2003b). O epitélio germinativo contínuo é formado por cistos (células de Sertoli e células germinativas) que se distribuem de forma contínua ao longo da membrana basal (Figura 4) (GRIER, 2002). A forma descontínua resulta da espermição dos cistos (liberação dos espermatozoides para o lúmen) e da não reposição imediata das células germinativas, o que gera trechos de células de Sertoli entremeados por alguns poucos e dispersos cistos de espermatogônias (Figura 4) (GRIER, 2002).

Na classificação tradicional, a classe regredida corresponde ao estágio de repouso. Durante a classe regredida, o epitélio germinativo é contínuo e formado por apenas espermatogônias e células de Sertoli (Figura 4). A classe regredida é caracterizada por intensa atividade mitótica, tanto das espermatogônias como das células de Sertoli. Em *Centropomus undecimalis* (GRIER & TAYLOR, 1998), ocorre a proliferação das espermatogônias e células de Sertoli, espalhadas por toda extensão dos lóbulos. Em outras espécies, como *Sciaenops ocellatus* (GRIER et al., 1998) e *Rachycentron canadum*

(BROWN-PETERSON et al., 2002), a proliferação resulta em cordões (sem lúmen), formados por espermatogônias e células de Sertoli, provenientes da porção distal dos lóbulos. Nos teleósteos adultos, a proliferação das células de Sertoli tem sido descrita por vários autores (BILLARD, 1969; GRIER, 1993; KOULISH et al., 2002; VILELA et al., 2003; SHULZ et al., 2003; LO NOSTRO et al., 2003b; CHAVES-POZO et al., 2005; SCHULZ et al., 2005) e fornecido subsídios para a compreender as sucessivas gerações de células de Sertoli a cada período reprodutivo (KOULISH et al., 2002; LO NOSTRO et al., 2003b), o crescimento testicular (VILELA et al., 2003; SHULZ et al., 2005) e para aumentar a produção espermática final das espécies (MATTA et al., 2002). Na maioria das espécies estudadas, as células de Sertoli proliferam em associação à cistos de espermatogônias, porém, também podem se dividir em cistos de espermatócitos e espermátides (BILLARD, 1969; KOULISH et al., 2002; VILELA et al., 2003; SHULZ et al., 2005). Com exceção do bagre africano, *Clarias gariepinus* (SCHULZ et al., 2003; SHULZ et al., 2005), não existem informações sobre a proliferação das células de Sertoli em teleósteos mais primitivos de estrutura testicular tubular anastomosado.

A classe de maturação inicial apresenta epitélio germinativo contínuo e constituído por cistos de espermatócitos e espermátides, indicando que a espermatogênese já foi iniciada (Figura 4) (GRIER, 2002). Na maturação intermediária, o epitélio permanece contínuo na porção distal do lóbulo, enquanto que na região próxima ao ducto testicular, o epitélio é descontínuo com luz repleta de espermatozóides (Figura 4) (GRIER, 2002). A maturação intermediária de *Centropomus undecimalis* (GRIER & TAYLOR, 1998; TAYLOR et al., 1998) detém o maior valor de índice gonadossomático durante o ciclo reprodutivo. Na maturação final, o epitélio germinativo é primeiramente descontínuo na região distal dos lóbulos (Figura 4). Com a espermição, o epitélio torna-se descontínuo em toda a extensão dos lóbulos e a luz do compartimento germinativo torna-se repleta de espermatozóides (Figura 4). Os centros melanomacrofágicos, envolvidos na remodelação tecidual, começam a surgir durante a maturação final de *Centropomus undecimalis* (GRIER & TAYLOR, 1998) e *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO, 2000; LO NOSTRO et al., 2003b). Em *Centropomus undecimalis* (GRIER & TAYLOR, 1998), as espermatogônias aparecem dispersas e já iniciam o repovoamento do epitélio germinativo. Em *Synbranchus*

marmoratus, o IGS atinge seu maior valor durante a maturação final (LO NOSTRO, 2000; LO NOSTRO et al., 2003). A classe de regressão é caracterizada por (1) queda no IGS; (2) epitélio germinativo descontínuo; (3) alguns cistos espermatogênicos (espermátocitos e espermátides) dispersos e em degeneração e (4) proliferação das espermatogônias para repovoar o epitélio germinativo descontínuo (Figura 4) (GRIER et al., 1998; BROWN-PETERSON et al., 2002; LO NOSTRO, 2000; LO NOSTRO et al., 2003b). Em *Centropomus undecimalis* (GRIER & TAYLOR, 1998) e *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO, 2000; LO NOSTRO et al., 2003b), a regressão é marcada por grande quantidade de centros melanomacrofágicos e intensa remodelação tecidual.

A descrição do epitélio germinativo e suas alterações anuais, divididas em cinco classes reprodutivas, foram realizadas até então em teleósteos mais derivados (de aparecimento recente na escala evolutiva) que apresentam testículo do tipo lobular. Em teleósteos mais basais (mais primitivos), cujo testículo é tubular anastomosado, as alterações do epitélio germinativo são documentadas apenas para *Pseudoplatystoma fasciatum* (Siluriformes: Pimelodidae) (BATLOUNI et al., 2006). Além disso, raros são os trabalhos que associam as alterações do epitélio germinativo com os mecanismos endócrinos testiculares. ROBERTS e colaboradores (1999) foram os primeiros a correlacionar os níveis de esteróides com as alterações do epitélio germinativo masculino.

As alterações do epitélio germinativo masculino podem ser aplicadas para um grande número de peixes teleósteos e sua correlação com outros parâmetros (IGS, dosagens hormonais, hipófise e outros) pode auxiliar na compreensão da biologia reprodutiva desses animais.

5. Células esteroideogênicas testiculares

O compartimento intersticial do testículo dos teleósteos e de outros animais cordados é constituído por elementos de tecido conjuntivo como: vasos sanguíneos, fibroblastos, nervos, células mióides e células de Leydig (GRIER et al., 1989; LOIR, 1990; CAUTY & LOIR, 1995; PUDNEY, 1995, 1996; LOIR et al., 1995).

As células de Leydig, isoladas ou em grupos, são geralmente encontradas próximas à vasos sanguíneos ou no tecido conjuntivo da cápsula testicular (PUDNEY, 1996;

KOULISH et al., 2002). A ultra-estrutura das células de Leydig tem sido descrita para vários teleósteos (BILLARD et al., 1982; NAGAHAMA, 1983; DODD & SUMPTER, 1986; BORGES FILHO, 1987; LOIR et al., 1989; GRIER et al., 1989; GRIER, 1993; CAUTY & LOIR, 1995; PUDNEY, 1996; ALTHAMER, 1999). Entretanto, questionamentos à respeito de sua origem, renovação e suas alterações durante o ciclo reprodutivo dos teleósteos continuam incertos (LOIR et al., 1989). Apesar das incertezas, não há dúvida sobre a função esteroidogênica das células de Leydig (LOIR et al., 1989; LOIR, 1990; PUDNEY, 1996; CALLARD, 1996). Morfologicamente, o potencial esteroidogênico das células de Leydig é evidenciado pela ultra-estrutura típica de célula produtora de esteróide, como retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e mitocôndrias com cristas tubulares (GURAYA, 1976; BILLARD et al., 1982; NAGAHAMA, 1983; DODD & SUMPTER, 1986; BORGES FILHO, 1987; LOIR et al., 1989; LOIR, 1990; CAUTY & LOIR, 1995; GRIER, 1981; GRIER et al., 1989; PUDNEY, 1996; ALTHAMER, 1999). Apesar da lipofilia também ser uma característica das células esteroidogênicas, na maioria dos teleósteos, as células de Leydig não apresentam inclusões lipídicas (BORGES FILHO, 1987; LOIR et al., 1989; CAUTY & LOIR, 1995; GRIER, 1981; GRIER et al., 1989; PUDNEY, 1996; ALTHAMER, 1999).

A enzima 3beta-hidroxiesteróide desidrogenase (3β -HSD) está envolvida em diversas etapas da biossíntese dos hormônios esteróides. É responsável pelas conversões de: (1) pregnenolona em progesterona; (2) 17α -hidroxipregnenolona em 17α -hidroxiprogesterona; (3) dehidroepiandrosterona em androstenediona; e (4) androstenediol em testosterona (MORSE & HELLER, 1973; HOYER & ANDERSEN, 1977; BORGES FILHO, 1987). A presença da 3β -HSD pode ser utilizada para localizar os sítios produtores de esteróides e para acompanhar o comportamento das células esteroidogênicas testiculares durante o ciclo reprodutivo dos teleósteos (YARON, 1966; VAN DEN HURK et al., 1978; SHANBHAG & NADKARNI, 1979; BORGES FILHO, 1987; LOIR, 1990; PUDNEY, 1996; LO NOSTRO, 2000).

6. O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e a hipófise dos teleósteos

A reprodução dos teleósteos, assim como dos demais vertebrados, é controlada pelo eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (Figura 5) (VAN OORDT & PEUTE, 1983; WELTZIEN et al., 2004). Sob influência de estímulos favoráveis (externos e internos), áreas específicas do hipotálamo liberam o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), que estimula a secreção dos hormônios gonadotrópicos (FSH e LH) pelas células gonadotrópicas da hipófise (Figura 5) (WELTZIEN et al., 2004). Os hormônios gonadotrópicos interagem com seus receptores gonadais e influenciam a produção de esteróides sexuais, responsáveis por sustentar a proliferação das células germinativas iniciais, a meiose, a espermiogênese, a espermição e a liberação dos gametas (Figura 5) (VAN OORDT & PEUTE, 1983; SHULZ & MIURA, 2002; MIURA & MIURA, 2003; WELTZIEN et al., 2004).

A hipófise, também denominada de pituitária, é responsável pelo controle hormonal de diversos processos fisiológicos, como crescimento, adaptação ambiental, metabolismo, osmorregulação e reprodução (BALL & BAKER, 1969; GRANDI et al., 2003; LAIZ-CARRIÓN, 2003; WELTZIEN et al., 2004).

Com mais de vinte mil espécies de peixes, ainda são poucas as espécies, cuja hipófise foi descrita. Nas espécies estudadas, a glândula hipofisária apresenta grande variação em estrutura e morfologia (BALL & BAKER, 1969; PRASADA RAO, 1969; FENERISH, 1975; VAL-SELLA, 1977; RUBAL et al., 1984; VAL-SELLA et al., 1986a,b; BORELLA, 1987,1993; LAIZ-CARRIÓN et al., 2003; GRANDI et al., 2003; CALA et al., 2003). Apesar das diferenças morfológicas, a hipófise dos teleósteos, assim como dos demais vertebrados, obedece a um padrão anatômico comum: é dividida em duas regiões de origem embriológica distinta; a adeno-hipófise e a neuro-hipófise (Figura 6) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A adeno-hipófise origina-se a partir da bolsa de Rathke, que é uma expansão do ectoderma do teto da boca primitiva (Figura 6). A bolsa de Rathke separa-se da cavidade bucal e origina a porção glandular da hipófise (adeno-hipófise) (Figura 6) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A neuro-hipófise surge de uma expansão do assoalho do diencéfalo em direção à bolsa de Rathke (Figura 6). A neuro-hipófise permanece em contato com o encéfalo através de um pedúnculo que constitui a comunicação entre a hipófise e o sistema nervoso central (Figura 6) (JUNQUEIRA &

CARNEIRO, 2004). Nos mamíferos, a neuro-hipófise é formada pela pars nervosa e pelo infundíbulo (pedúnculo), que constituem um lobo isolado em relação à adeno-hipófise (Figura 6). Nesses animais, a interação entre a neuro-hipófise e a adeno-hipófise ocorre através do sistema porta hipofisário (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Nos peixes, a adeno-hipófise é constituída por três regiões, que apresentam diferenças quanto à (1) distribuição das células produtoras de hormônios, (2) características tintoriais e (3) ramificação da neuro-hipófise. Essas regiões são conhecidas como “*rostral pars distalis*” (RPD), “*proximal pars distalis*” (PPD) e “*pars intermedia*” (PI) (Figura 7A,C,D) (BALL & BAKER, 1969; PRASADA RAO, 1969; FENERISH, 1975; VAL-SELLA, 1977; RUBAL et al., 1984; VAL-SELLA et al., 1986a,b; BORELLA, 1987,1993; LAIZ-CARRIÓN et al., 2003; GRANDI et al., 2003; CALA et al., 2003). A RPD recebe os primeiros ramos da neuro-hipófise e ocupa a região mais anterior e ventral da glândula (Figura 7A,C,D). A PPD situa-se entre a RPD e a PI, sendo que esta última recebe a maior quantidade dos ramos da neuro-hipófise e apresenta localização posterior e dorsal na glândula (Figura 7A,C,D) (BALL & BAKER, 1969; PRASADA RAO, 1969; FENERISH, 1975; VAL-SELLA, 1977; RUBAL et al., 1984; VAL-SELLA et al., 1986a,b; BORELLA, 1987,1993; LAIZ-CARRIÓN et al., 2003; GRANDI et al., 2003; CALA et al., 2003). Nos teleósteos, a neuro-hipófise é formada pela pars nervosa que penetra e se ramifica no interior da adeno-hipófise (Figura 7A,C,D,G). Dessa forma, o neurônio inerva diretamente a célula produtora de hormônio, com ausência de sistema porta hipofisário (Figura 7G) (BALL & BAKER, 1969; WELTZIEN et al., 2004).

De acordo com BRETSCHNEIDER & DUYVENÉ DE WIT (1947) (apud BORELLA, 1987), a hipófise dos teleósteos pode ser classificada em “*leptobasic*” ou “*platibasic*”. A terminologia supracitada refere-se, respectivamente, à hipófise quando ligada ao diencéfalo através de um pedúnculo bem definido, ou quando está associada à neuro-hipófise, sem a formação de um pedúnculo.

7. As células produtoras de hormônios da adeno-hipófise

Nos teleósteos, as células da adeno-hipófise têm sido caracterizadas através de técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas (BALL & BAKER, 1969; PRASADA RAO,

1969; FENERISH, 1975; VAL-SELLA, 1977, 1985; RUBAL et al., 1984; VAL-SELLA et al., 1986a,b; BORELLA, 1987,1993; PARREIRA, 1998, 2002; BORELLA et al., 2003; LAIZ-CARRIÓN et al., 2003; GRANDI et al., 2003; CALA et al., 2003). Os hormônios da adeno-hipófise podem ser agrupados em três famílias conforme suas características químicas e moleculares: (a) família das somatotropinas e prolactinas, incluindo a somatotropina ou hormônio do crescimento (GH), a prolactina (PRL) e a somatolactina (SL); (b) família dos hormônios glicoprotéicos, contendo as gonadotropinas (GTH: FSH e LH) e a tireotropina (TSH) e (c) família dos hormônios derivados de proopiomelanocortina, como a corticotropina (ACTH) e a melanotropina (MSH) (BATTEN & INGLETION, 1987). Apesar das variações na distribuição das células adeno-hipofisárias, em geral, a RPD possui células produtoras de PRL e ACTH; a PPD contém células produtoras de GTH, TSH e GH; e a PI caracteriza-se pelas células produtoras de SL e MSH (Figura 7G) (BALL & BAKER, 1969; LAIZ-CARRIÓN et al., 2003; GRANDI et al., 2003; CALA et al., 2003).

8. As células gonadotrópicas

As células gonadotrópicas dos teleósteos têm sido objeto de estudos em várias pesquisas (ver revisão em WELTZIEN et al., 2004) devido sua importância no controle endócrino da reprodução (VAN OORDT & PEUTE, 1983). Localizam-se na PPD e são identificadas através de métodos histoquímicos e por suas variações (em número e estrutura) durante a maturação sexual ou em condições experimentais (BALL & BAKER, 1969; VAN OORDT & PEUTE, 1983).

As células gonadotrópicas são semelhantes às células tireotrópicas: ambas são basófilas e localizam-se na PPD (HOLMES & BALL, 1974). Apesar das semelhanças, os dois tipos celulares são distinguidos pela forma, tamanho e por métodos histoquímicos como PAS e PAS+Alcian Blue (AB) (Figura 7F) (HOLMES & BALL, 1974; VAN OORDT & PEUTE, 1983). As células tireotrópicas são pequenas, fusiformes e reagem mais ao Alcian Blue do que ao PAS (Figura 7F). As células gonadotrópicas são volumosas, basófilas, com núcleo excêntrico e reagem mais ao PAS do que ao Alcian Blue (Figura 7E,F) (BALL & BAKER, 1969; PRASADA RAO, 1969; FENERISH, 1975; VAL-SELLA, 1977, 1985; RUBAL et al., 1984; VAL-SELLA et al., 1986a,b; BORELLA, 1987,1993;

PARREIRA, 1998, 2002; BORELLA et al., 2003). Através da microscopia eletrônica de transmissão, as células gonadotrópicas são caracterizadas por citoplasma repleto de grânulos elétron-densos, complexo de Golgi bem desenvolvido e cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso (VAL-SELLA & SESSO, 1980a,b; PARREIRA, 1998, 2002). Durante o ciclo reprodutivo, as células gonadotrópicas variam em número, tamanho, e grau de vacuolização (SUNDARARAJ, 1959; BALL & BAKER, 1969; VAL-SELLA & SESSO, 1980a,b; BORELLA, 1987; PARREIRA, 1998,2002; BURNS, 1991).

A imuno-histoquímica foi um dos passos mais importantes na identificação das células gonadotrópicas dos peixes. Inicialmente, os estudos eram conduzidos com anticorpos para gonadotropinas de mamíferos (MCKEOWN & VAN OVERBEEKE, 1971; BORELLA, 1993; GAZOLA, 1993) e atualmente são realizados com anticorpos purificados de teleósteos como de carpa, salmão, bagre e outros (revisão em WELTZIEN et al., 2004). Na maioria das reações imuno-histoquímicas (tanto para anticorpos de mamíferos como de peixes), é comum que as células tireotrópicas apresentem marcação para os anticorpos de gonadotropinas. A reação cruzada é devido à similaridade estrutural dos hormônios gonadotrópicos e tireotrópicos (Figura 7H-J), que são glicoproteínas constituídas por duas subunidades, α e β (Figura 7H-J). A subunidade α é comum aos dois hormônios (BURZAWA-GÉRARD, 1974), enquanto que a subunidade β é variável e responsável pela atividade biológica de cada hormônio (Figura 7H-J) (FONTAINE & BURZAWA-GÉRARD, 1977; SCHREIBMAN & MARGOLIS-KAZAN, 1979; OLIVEREAU & NAGAHAMA, 1983).

O uso de anticorpos específicos para a subunidade β (β -FSH e β -LH) tem mostrado que o FSH e o LH são sintetizados em células gonadotrópicas diferentes, como documentado para os teleósteos *Salmo gairdneri irideus* (NOZAKI et al., 1990a,b), *Oncorhynchus mykiss* (NAITO et al., 1991), *Xiphophorus maculatus* (KIM et al., 1994), *Alosa sapidissima* (LAIZ-CARRIÓN et al., 2003) e outros. Por outro lado, a existência de uma única população de células gonadotrópicas é reportada em *Clarias gariepinus* (KOIDE et al., 1992) e *Seriola dumerili* (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 1996). A divergência apresentada pode ser atribuída à diversidade reprodutiva dos teleósteos como também ao uso de anticorpos não tão específicos.

9. *Serrasalmus spilopleura* e *Pimelodus maculatus* como modelos experimentais

S. spilopleura pertence à ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Serrasalminae. Também pode ser denominada de pirambeba, por não ser tão agressiva quanto às demais espécies de piranhas (LAMAS & GODINHO, 1996; FUJIHARA, 1997). Apresenta boa adaptação a ambientes lênticos e pode ser encontrada nos principais reservatórios brasileiros (BRAGA, 1956; PAIVA, 1958; LAMAS & GODINHO, 1996; FUJIHARA, 1997; TELES & GODINHO, 1997), onde sua reprodução é contínua, embora mais freqüente na época das chuvas (LAMAS & GODINHO, 1996; FUJIHARA, 1997). Apesar de não terem valor econômico, são utilizadas como fonte de alimento pelas populações ribeirinhas (BRAGA, 1956).

P. maculatus pertence à ordem Siluriformes e à família Pimelodidae. É conhecido como bagre-amarelo, mandi-amarelo, mandi-pintado ou mandiúva. É uma espécie de ampla distribuição, sendo encontrada em várias bacias hidrográficas da América do Sul (GODOY, 1987). Na bacia do rio São Francisco, o *P. maculatus* é muito apreciado na pesca profissional e esportiva (SATO et al., 1997). Sua reprodução é sazonal com desova parcelada no período de outubro a janeiro, podendo ser antecipada ou atrasada, uma vez que está sob influência de fatores abióticos como temperatura, chuva e nível das águas do rio (GODINHO et al., 1974, 1977; FENERISH, 1975; BAZZOLI et al., 1997).



Serrasalmus spilopleura



Pimelodus maculatus

10. Objetivos gerais

Através de ferramentas morfológicas (histologia, microscopia eletrônica e imuno-histoquímicas), pretende-se descrever e comparar dois tipos de ciclos reprodutivos; contínuo em *S. spilopleura* e descontínuo/sazonal em *P. maculatus*, analisando o epitélio germinativo, as células esteroidogênicas testiculares e as células gonadotrópicas com o intuito de fornecer subsídios para melhor compreender a fisiologia reprodutiva dos peixes teleósteos neotrópicos de água doce.

11. Objetivos específicos

- 1) Descrever através de parâmetros histológicos e ultra-estruturais, as alterações do epitélio germinativo masculino durante o ciclo reprodutivo de *S. spilopleura* e *P. maculatus*;
- 2) Analisar através de imuno-histoquímica (PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular) a atividade mitótica das espermatogônias e das células de Sertoli durante o ciclo reprodutivo;
- 3) Localizar as células esteroidogênicas testiculares através de histoquímica enzimática (3 β -HSD) e correlacionar seu comportamento esteroidogênico com as alterações do epitélio germinativo;
- 4) Identificar as células gonadotrópicas e verificar suas alterações durante o ciclo reprodutivo de *S. spilopleura* e de *P. maculatus* através de sua estrutura e imuno-histoquímica com os anticorpos anti-salmon β -LH e anti-salmon β -FSH.

FIGURAS

Figura 1. A-C: Estrutura testicular de acordo com a organização do compartimento germinativo na periferia do testículo (cabeça de seta). Retirado de Grier (1993). **A:** Tubular (T). O compartimento germinativo forma alças que se estendem da periferia até a rete testis (RT). **B:** Tubular anastomosado (AT). O compartimento germinativo constitui-se de um sistema altamente ramificado de alças e tubulos que se interconectam da periferia até o ducto testicular principal (MD). **C:** Lobular (L). O compartimento germinativo termina em formato digitiforme (em fundo cego) e pode sofrer ramificações (anastomoses) apenas na região próxima ao ducto testicular principal (MD). **D:** Testículo lobular de *Cichla intermedia* (Perciformes: Cichlidae). A região delimitada corresponde à Fig. F. Barra = 300µm. **E:** Testículo tubular anastomosado de *Megalops atlanticus* (Elopiformes: Elopidae). Retirado de Grier & Parenti (2004). Barra = 100µm. **F:** Detalhe da periferia testicular de *C. intermedia*. Cabeças de setas indicam ninhos de espermatogônias próximos à túnica albugínea (TC). Barra = 50µm. Cistos (CY); epitélio germinativo (GE); espermatozoides (SP) e interstício (I). **D-F:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow.

Figura 1

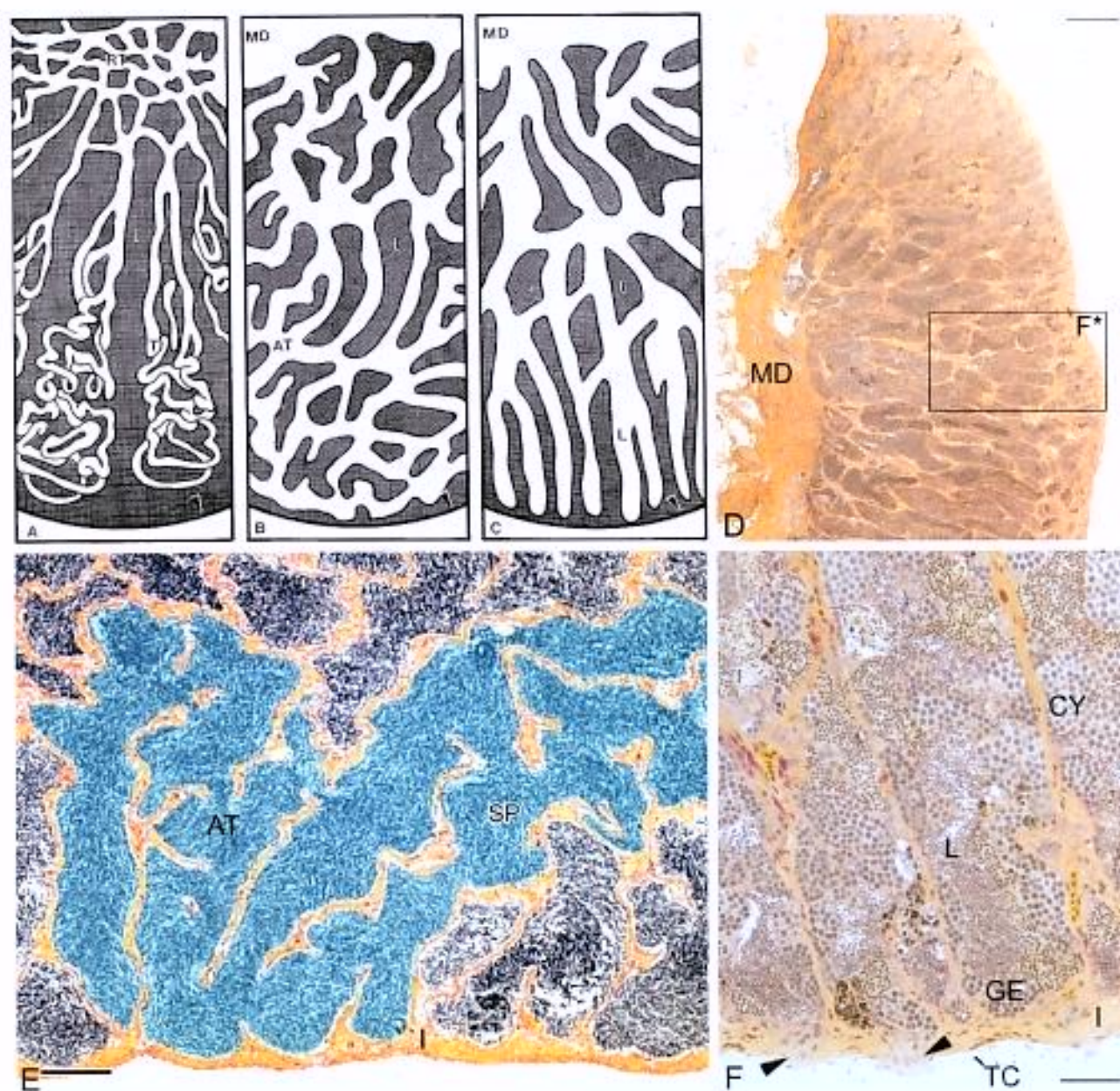


Figura 2. A-B: Distribuição das espermatogônias nos testículos lobulares. Retirado de Nagahama (1983). **A:** Irrestrito. As espermatogônias estão espalhadas por toda extensão dos lóbulos. **B:** Restrito. As espermatogônias estão confinadas na porção distal (próximo à túnica albugínea) dos lóbulos. **C:** Testículo lobular irrestrito de *C. intermedia* (Perciformes: Cichlidae). Barra = 10µm. **D:** Testículo lobular restrito de *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes: Atherinopsidae). A cabeça de seta indica epitélio do ducto testicular principal (MD). Cedido gentilmente pela Dra. Fabiana Laura Lo Nostro. Barra = 10µm. **E:** Testículo lobular restrito de *Xiphophorus maculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). A região delimitada mostra um lóbulo (L) que conflui para o ducto testicular principal (MD). Nesse tipo de estrutura, o compartimento germinativo não possui luz e não sofre ramificações na região próxima ao ducto. Barra = 100µm. **F:** Detalhe do testículo lobular restrito de *X. maculatus*. Durante a espermatogênese, os cistos são deslocados gradualmente em direção ao ducto principal (MD). Com a espermição, os espermatozocugmatas (SZ) (pacotes de espermatozoides unidos pelos flagelos) são liberados dos cistos e as células de Sertoli incorporam-se ao epitélio do ducto e exibem atividade secretora (cabeça de seta). Barra = 50µm. **G:** Detalhe de um espermatozocugmata (SZ). Barra = 10µm. Cápsula testicular (TC); espermatócitos (SC); espermatogônias (SG); espermatogônias do tipo A (SGA); espermatogônias do tipo B (SGB); espermátides em diferentes etapas da espermiogênese (ST*); espermatozoides (SP); interstício (I). **C,E-G:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow, **D:** Hematoxilina/Eosina.

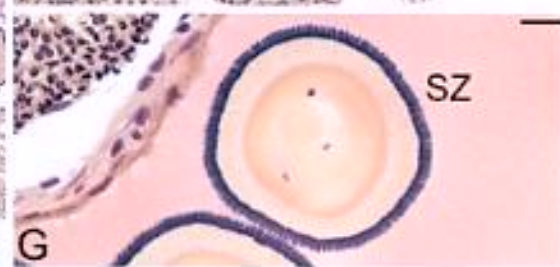
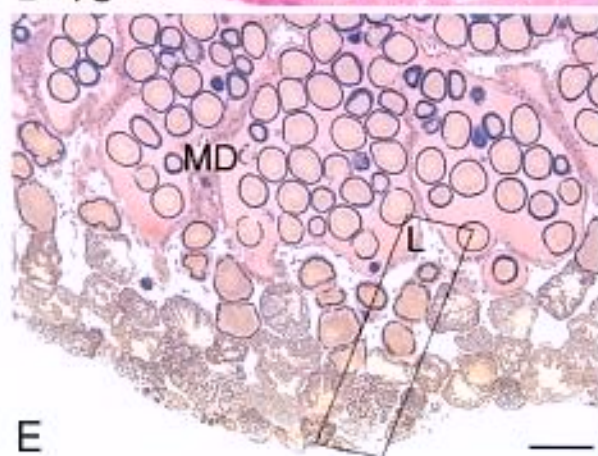
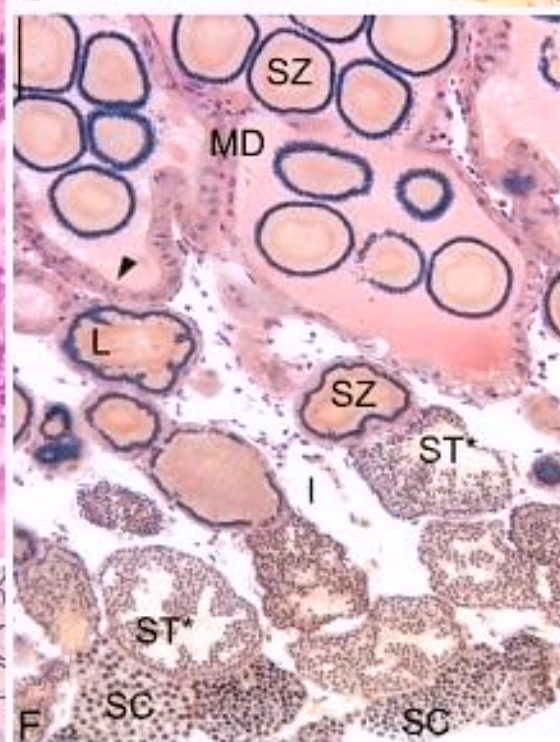
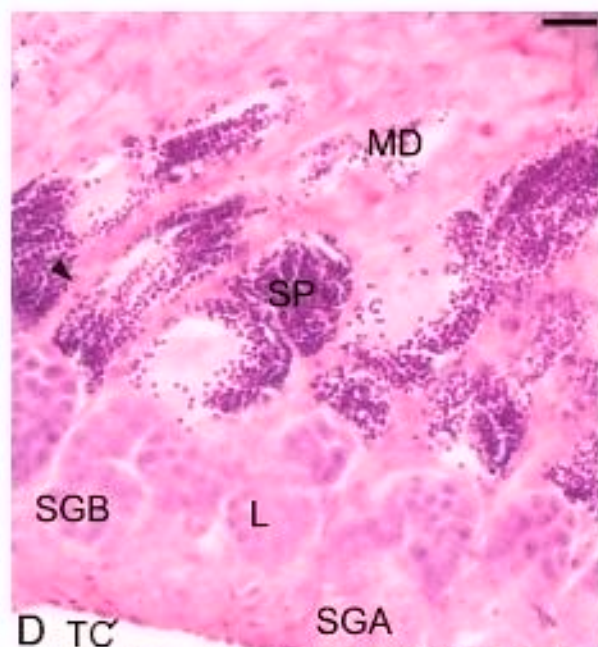
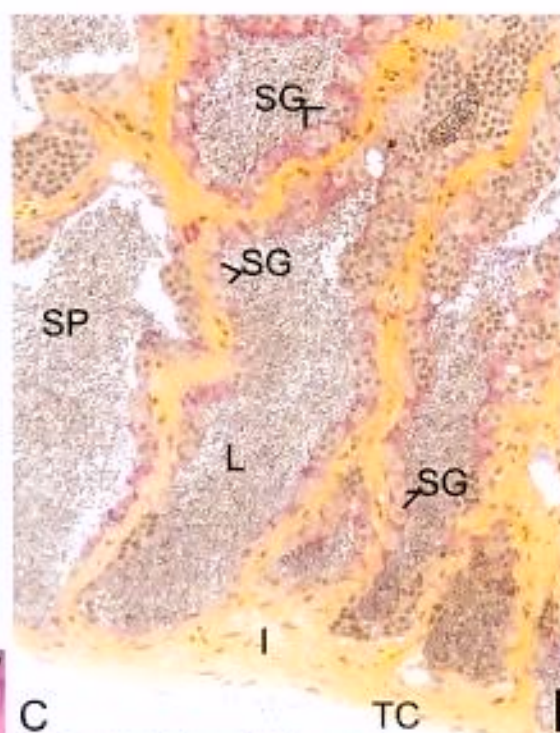
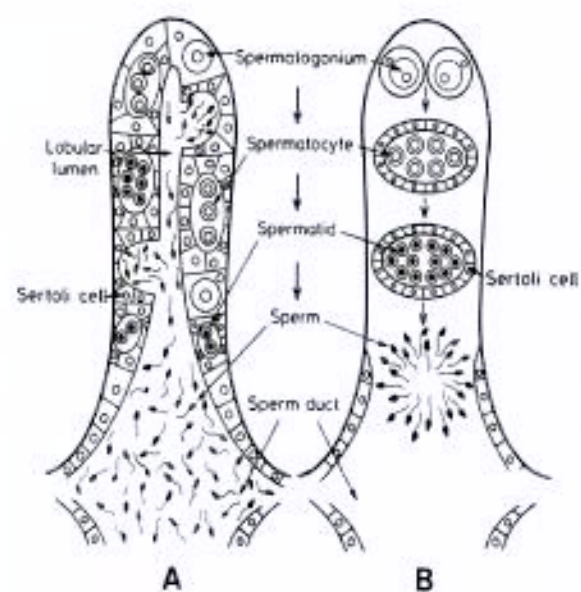
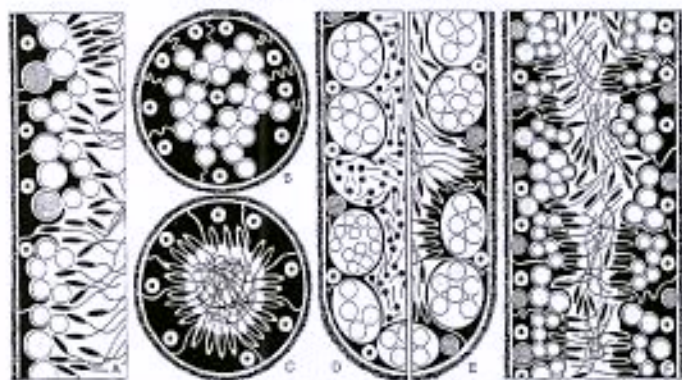


Figura 3. A-F: O compartimento germinativo durante a evolução dos cordados. Retirado de Grier (1992). **A:** Nos cefalocordados e urocordados, as células germinativas desenvolvem-se nos processos citoplasmáticos das células de Sertoli, sem formarem cistos. A unidade espermatogênica é denominada de pré-espermatocisto, considerada a organização testicular mais primitiva dentro dos cordados. Notar que a membrana basal separa o compartimento germinativo do intersticial. **B:** Agnatas; **C:** Elasmobrânquios; **B,C:** Nos agnatas e elasmobrânquios, os cistos, ou espermatocistos, formam-se a partir de espermatogônias que são envoltas e seqüestradas do interstício pelos processos citoplasmáticos das células de Sertoli. A espermatogênese ocorre no interior do cisto e em geral as células germinativas, em desenvolvimento sincrônico, estão conectadas por pontes citoplasmáticas. Nesses animais, os cistos estão envoltos completamente por uma membrana basal que os separa do compartimento intersticial. Como o testículo é formado por vários cistos individualizados, a unidade espermatogênica é denominada de poli-espermatocisto. **D:** Peixes; **E:** Anfíbios (anuros); **D,E:** Nos peixes e anfíbios, a membrana basal não envolve completamente os cistos. Os cistos desenvolvem-se de forma contínua ao longo da membrana basal, que é responsável por definir a organização do compartimento germinativo em lobular ou tubular anastomosado. No testículo lobular, presente nos peixes mais derivados e nos anfíbios (**D** e **E**, respectivamente), a membrana basal termina em fundo cego, enquanto que nos peixes mais primitivos, a membrana basal forma uma rede altamente ramificada em todo o testículo. Em geral, nos peixes (**D**), os cistos se abrem após o término da espermatogênese. Nos anfíbios (**E**), os cistos se abrem antes do final da espermatogênese, e os espermatozoides continuam associados às células de Sertoli até completarem sua maturação. **F:** Répteis, aves e mamíferos. Nos amniotas, a membrana basal forma alças que se estendem da periferia até a rete testis. Esse tipo de organização define a estrutura tubular. Não existem cistos (por isso, pós-espermatocisto) e as células germinativas, conectadas por pontes citoplasmáticas, desenvolvem-se nos processos e criptas citoplasmáticas das células de Sertoli. **G:** Os cistos dos peixes teleosteos são formados por células germinativas (GC), conectadas por pontes citoplasmáticas (b) e em desenvolvimento sincrônico, envoltas pelos processos citoplasmáticos das células de Sertoli (*). Espermatogônia (sgn); espermatozoides (spn). Retirado de Grier (1993). **H:** Compartimento germinativo e intersticial do teleosteo *Serrasalmus spilopleura*. Notar que o epitélio germinativo é formado por cistos. Barra = 10µm. **I:** A coloração PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow permite delimitar nitidamente a membrana basal (lâmina basal + fibras reticulares) do testículo de *S. spilopleura*. Barra = 10µm. **J,K:** A impregnação por prata também permite delimitar a membrana basal dos testículos de *S. spilopleura*. Notar que o testículo é dividido em dois compartimentos, separados pela membrana basal. Assim como a membrana basal, as células de Leydig, pela grande quantidade de mitocôndrias, também são argirófilas. **J.** Barra = 100µm. **K.** Barra = 10µm. **L:** Espermatogênese cística. **M:** Espermatogênese semi-cística. Células de Leydig (LE); células de Sertoli (SE); células em divisão (CD); cistos (CY); compartimento germinativo (GC); compartimento intersticial (IC); epitélio germinativo (GE); espermátides (ST); espermatócitos (SC); espermatogônias (SG); espermatozoides (SZ); espermição (cabeça de seta); membrana basal (BM). **H,I:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow; **J,K:** Impregnação por prata.

Figura 3

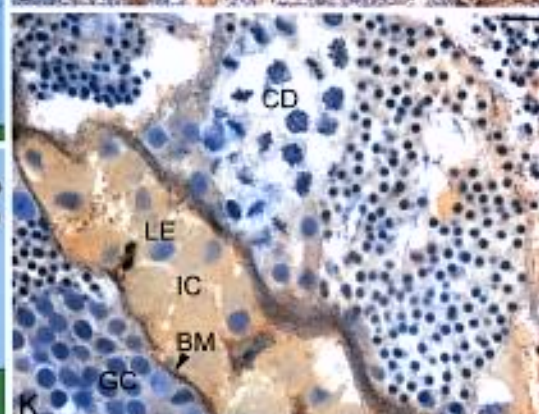
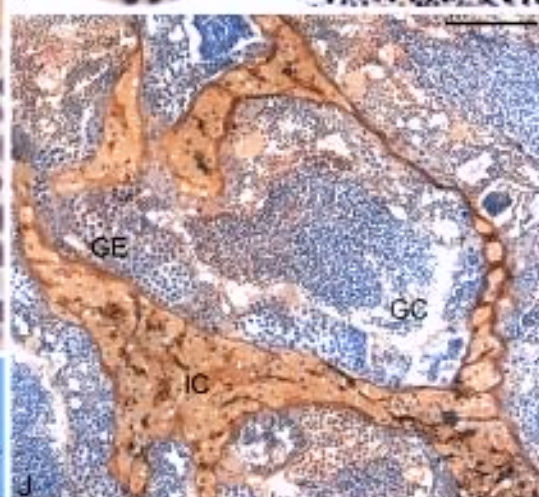
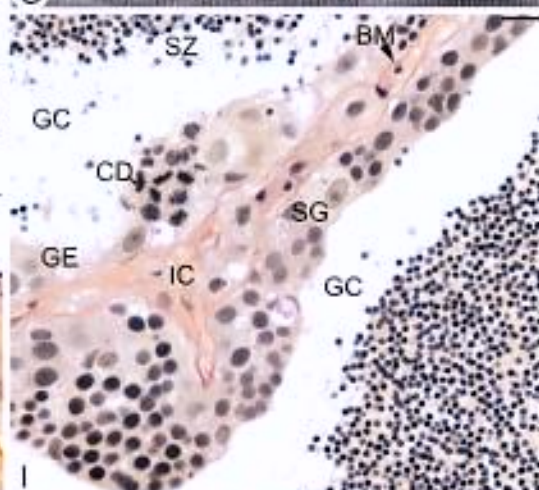
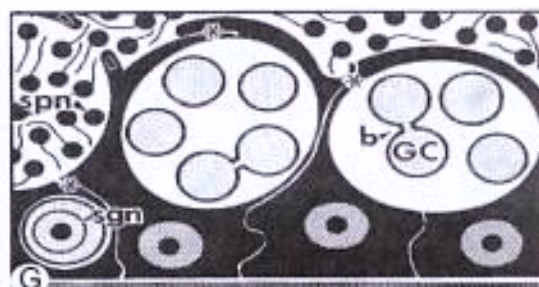
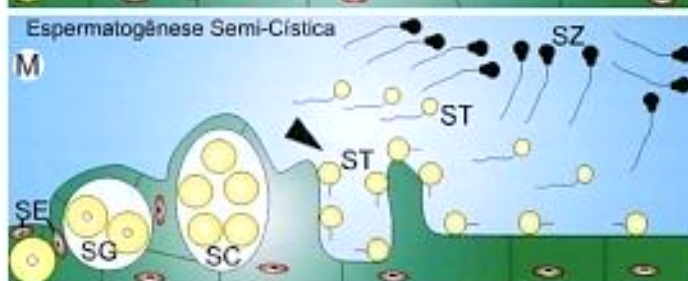
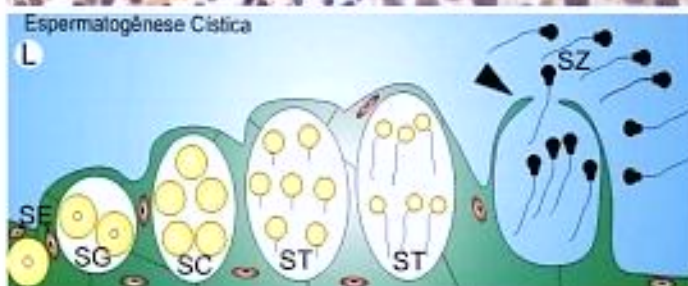
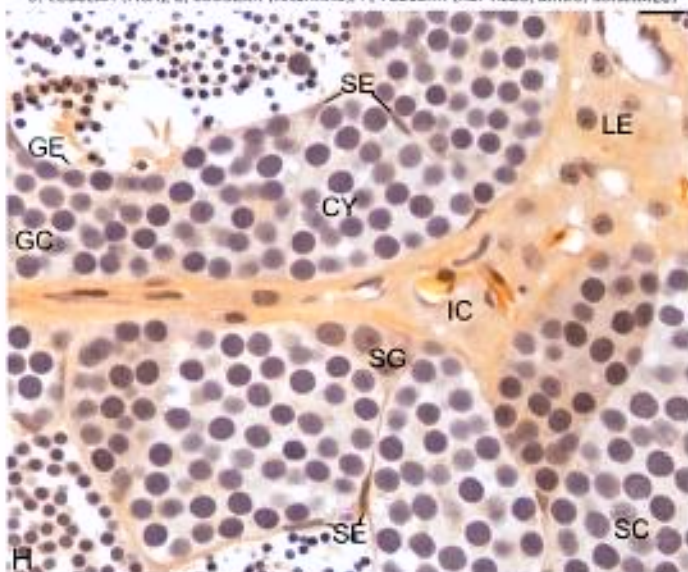
EVOLUTION OF THE CHORDATE SPERMATOCYST



A. PRESPERMATOCYSTIC (CEPHALOCHORDATES, UROCHORDATES)

B. POLYSPERMATOCYSTIC (AGNATHANS); C. POLYSPERMATOCYSTIC (ELASMOBRANCHS)

D. LOBULAR (FISH); E. LOBULAR (ANURANS); F. TUBULAR (REPTILES, BIRDS, MAMMALS)



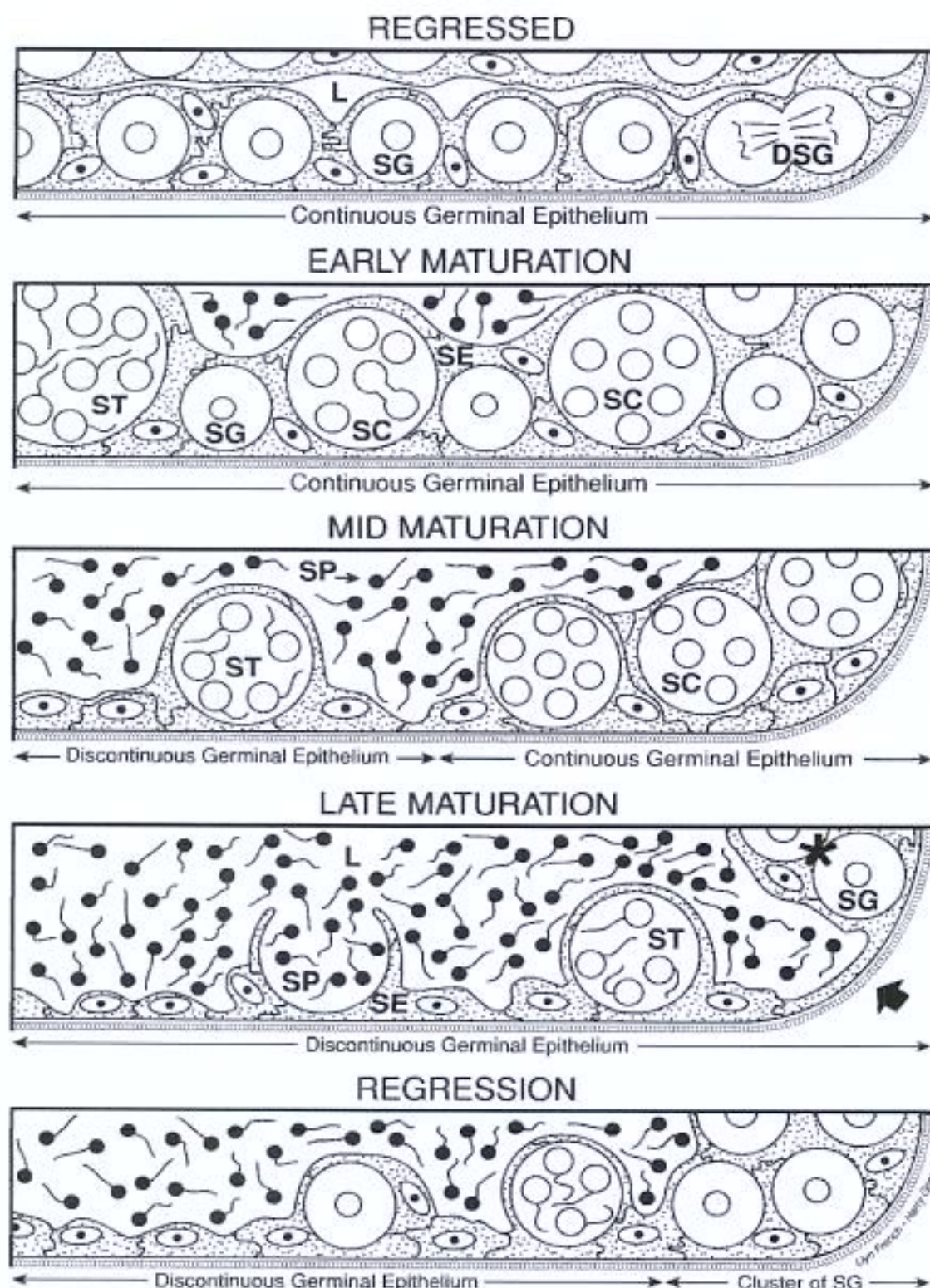


Figura 4. Classes reprodutivas definidas com base nas alterações anuais do epitélio germinativo masculino em testículos lobulares. Espermatogônia (SG); espermatogônias em divisão (DSG); espermatócitos (SC); espermatídes (ST); espermatozóides (SP); células de Sertoli (SE); lúmen (L); espermação (seta); aglomerados de espermatogônias (asterisco). Retirado de Grier (2002).

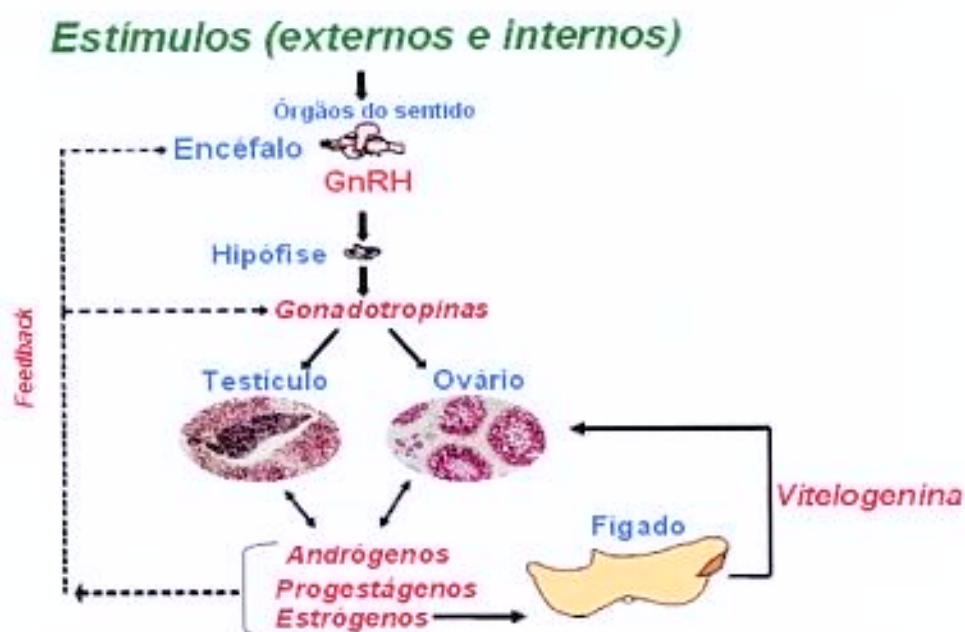


Figura 5. O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal dos peixes teleosteos.

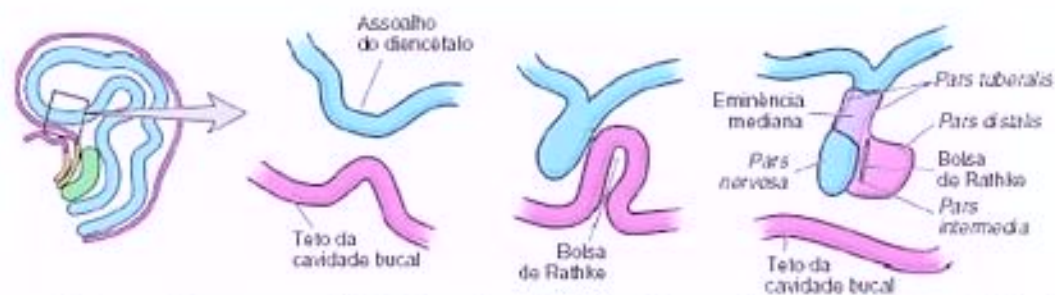
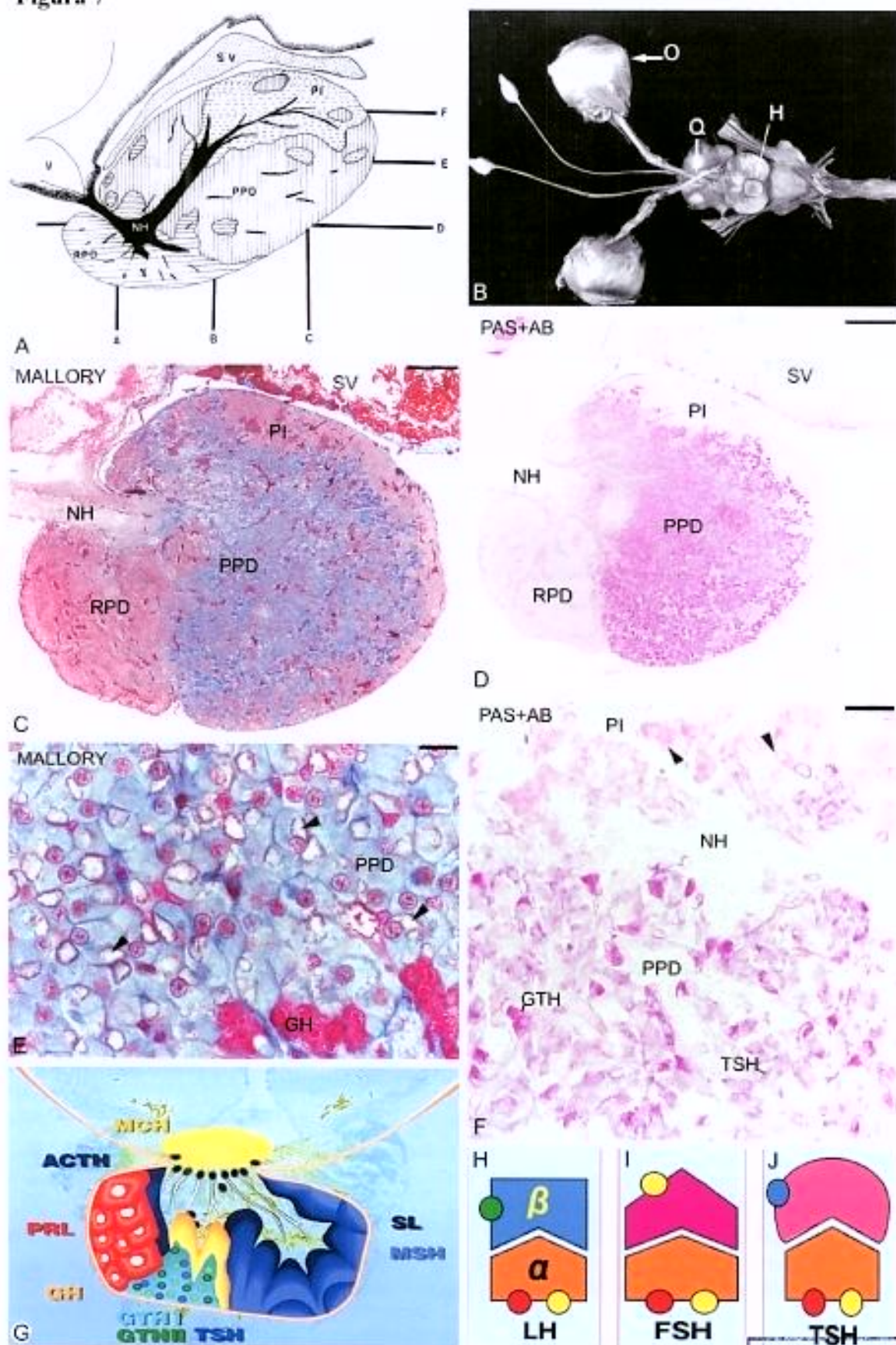


Figura 6. Desenvolvimento embriológico da adeno-hipófise e da neuro-hipófise. Retirado de Junqueira & Carneiro (2004).

Figura 7. A: Esquema geral da hipófise de *Rhamdia hilarii*. A adeno-hipófise é subdividida em três regiões: "rostral pars distalis" (RPD), "proximal pars distalis" (PPD) e "pars intermedia" (PI). A neuro-hipófise (NH) é constituída pela pars nervosa que penetra e se ramifica no interior da adeno-hipófise. 3º Ventriculo (V), saco vascularizado (SV). Retirado de Val-Sella (1977). B: Face ventral do encéfalo dissecado de *R. hilarii*. Retirado de Val-Sella (1977). Hipófise (H); olho (O); quiasma óptico (Q). C: Hipófise de *Pimelodus maculatus* corada com Tricrômico de Mallory. Barra = 200µm. D: Hipófise de *P. maculatus* corada com PAS+Alcian Blue. Notar que a PPD reage intensamente ao PAS. Barra = 200µm. E: Detalhe da PPD da hipófise de *Serrasalmus spilopleura*. As células gonadotrópicas são as células mais abundantes da PPD. São basófilas, volumosas e possuem núcleo excêntrico e citoplasma dotado de vacúolos de diferentes tamanhos (cabeças de seta). Células somatotrópicas (GH). Barra = 10µm. F: Detalhes da PPD e PI da hipófise de *P. maculatus* corada com PAS+AB. As células gonadotrópicas (GTH) reagem mais ao PAS do que ao AB. As células tireotrópicas (TSH) são fusiformes e reagem mais ao AB do que ao PAS. As cabeças de setas indicam que algumas células na PI, as células produtoras de somatolactina (SL), coram-se fracamente ao PAS. Barra = 20µm. G: Distribuição das células produtoras de hormônios na adeno-hipófise dos peixes teleosteos. Retirado do site do Dr. Nagahama (www.nibb.ac.jp). RPD: células produtoras de PRL e ACTH. PPD: produção de GH, GTH e TSH. PI: células produtoras de MSH e SL. Notar que as células produtoras de hormônios são inervadas diretamente pelos ramos da neuro-hipófise. Retirado do site do Dr. Nagahama (www.nibb.ac.jp). H,I,J: Estrutura dos hormônios LH, FSH e TSH respectivamente. Esses hormônios são glicoproteínas constituídas por duas subunidades; a α que é comum aos três e a β que é variável e determina a atividade biológica de cada hormônio.

Figura 7



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL¹

- AGOSTINHO, A.A.; BARBIERI, M.C.; AGOSTINHO, C.S.; BARBIERI, G. Biologia reprodutiva de *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829) (TELEOSTEI, LORICARIIDAE) no rio Paranapanema. I. Estrutura dos Testículos e Escala de Maturidade. **Rev. Brasil. Biol.**, 47(3):309-317, 1987.
- ALTHAMMER, B.B. **Avaliações ultraestruturais das células do interstício e císticas do testículo da piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), durante o ciclo sexual.** Dissertação de Mestrado. Centro de Aquicultura – UNESP – Jaboticabal, 1999.
- AZEVEDO, C.L.; BARBIERI, M.C.; BARBIERI, G. Ciclo reprodutivo de *Parodon tortuosus* (Eigenmann and Norris, 1900) do rio passa-cinco, Ipeúna – SP. I. Estádios de Maturação dos testículos. Época de reprodução. **Rev. Brasil. Biol.**, 48(3):565-569, 1988.
- BALL, J.N.; BAKER, B.I. The Pituitary Gland: Anatomy and Histophysiology. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. editors. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, volume 2, 1969.
- BARBIERI, M.; BARBIERI, G. Reprodução de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na represa do Lobo (SP). Morfologia e Histologia de testículo. Variação sazonal. (Pisces, Gymnotidae). **Rev. Brasil. Biol.**, 44(2):141-148, 1984.
- BATLOUNI, S.R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M.I. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addresses to aquaculture. **Anim. Reprod. Sci.**, doi:10.1016/j.anireprosci.2005.11.012, 2006.
- BATTEN, T.F.C.; INGLETON, P.M. The hypothalamus and pituitary gland. The structure and function of the hypothalamus and pituitary gland. In: CHESTER-JONES, I.; INGLETON, P.M.; PHILLIPS, J.G. editors. **Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology**. New York: Plenum Press, chapter III, p.283-409, 1987.
- BAZZOLI, N.; CANGUSSU, L.C.V.; RIZZO, E.; SANTOS, G.B. Reprodução e desova de mandis *Pimelodus maculatus* e *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) nos reservatórios de Furnas, Marimondo e Itumbiara. **BIOS, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas**, v.5, n.5, p.7-15, 1997.
- BILLARD, R. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata* I. Estimation du nombre de generations goniales et rendement de la spermatogenèse. **Ann. Biol. Bioch. Biophys.** 9:251-271, 1969.
- BILLARD, R.; FOSTIER, A.; WEIL, C.; BRETON, B. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. **Can J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 39, p.65-79, 1982.
- BORELLA, M.I. **Caracterização bioquímica parcial e imunocitoquímica do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) no encéfalo e imunocitoquímica dos hormônios gonadotrópicos e do GnRH na hipófise do pacu (*Piaractus***

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- mesopotamicus*, Pisces, Teleostei). Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1993.
- BORELLA, M.I. **Observações morfológicas e citoquímicas sobre a adenohipófise de curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. Estudo morfométrico das células gonadotrópicas.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1987.
- BORELLA, M. I.; VENTURIERI, R.; MANCERA, J. M. Estudo histoquímico e imuno-histoquímico da hipófise do osteoglossídeo amazônico pirarucu (*Arapaima gigas*): Resultados preliminares In: **XV Encontro Brasileiro de Ictiologia, 2003, São Paulo. CD.**, 2003.
- BORGES FILHO, O.F. **Caracterização dos Estádios de Maturação e Correlação com Avaliações Histoquímico-Enzimáticas e Ultra-Estruturais das Células Endócrinas Testiculares, durante o Ciclo Reprodutivo do *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881.** São Paulo: Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1987.
- BRAGA, R.A. Caráter sexual secundário da pirambeba, *Serrasalmus rhombeus* (L. 1766) Lacépède, 1803 (Ostariophysi, Characidae, Serrasalminae). **Rev. Brasil. Biol.**, 16:167-180, 1956.
- BRETSCHNEIDER, L.H.; DUYVENE DE WIT, J.J Sexual endocrinology of non mammalian vertebrates. **Monor. Prog. Res. Holland During War**, Amsterdam, 11:146, 1947.
- BROWN-PETERSON, N.J.; WARREN, J.W. The reproductive biology of spotted sea trout, *Cynoscion nebulosus*, along the Mississippi Gulf Coast. **Gulf. Mex. Sci.**, 2001:61-73, 2001.
- BROWN-PETERSON, N. J.; GRIER, H. J.; OVERSTREET, R. M. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. **J. Fish Biol.**, 60:178-202, 2002.
- BURNS, J.R. Testis and Gonopodium Development in *Anableps dowi* (Pisces: Anablepidae) Correlated with Pituitary Gonadotropic Zone Area. **J. Morphol.**, 210:45-53, 1991.
- BURZAWA-GÉRARD, E. Séparation et réassociation des sous-unités de l'hormone gonadotrope d'une poisson téléostéen, la carpe (*Cyprinus carpio* L.) **CR. Acad. Sci. Paris Sec. D.**, 279:80-91, 1974.
- BURZAWA-GÉRARD, E.; FONTAINE, Y.A. The gonadotropins of lower vertebrates. **Gen. Comp. Endocrinol.**, suppl. 3, p.715-728, 1972.
- CALA, F.S.; PORTILLO, A.; MARTÍN DEL RÍO, M.P; MANCERA, J.M. Immunocytochemical characterization of adenohipophyseal cells in the greater weever fish (*Trachinus draco*). **Tissue & Cell**, 35:169-178, 2003.
- CALLARD, I.P.; CALLARD, G.V.; LANCE, V.; BOLAFFI, J.L.; ROSSET, J.L.; ROSSET, J.S. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. **Biol. Reprod.**, 18:16-43, 1978.
- CALLARD, G.V. Endocrinology of Leydig Cells in Nonmammalian Vertebrates. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSEL, L.D. editors. **The Leydig Cell**. Vienna, IL: Cache River Press. p.308-331, 1996.

- CAUTY, C.; LOIR, M. The interstitial cells of the trout testis (*Oncorhynchus mykiss*): ultrastructural characterization and changes throughout the reproductive cycle. **Tissue & Cell**, 27(4):383-395, 1995.
- CHAVES-POZO, E.; MULERO, V.; MESEGUER, J.; AYALA, A.G. An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Biol. Reprod.**, 72:593-601, 2005.
- DODD, J.M. The endocrine regulation of gametogenesis and gonad maturation in fishes. **Gen. Comp. Endocrinol.**, suppl. 3:675-87, 1972.
- DODD, J.M.; SUMPTER, J.P. Fishes. In: CHURCHILL, G.E.L. editor. **Marshall's Physiology of reproduction**. New York: Academic Press, p.1-126, 1986.
- FARBRIDGE, K.L.; LEATHERLAND, J.F. A comparative immunohistochemical study of the pars distalis in six species of teleost fishes. **Fish Physiol. Biochem.**, 1:63-74, 1986.
- FENERISH, N.A. **Hipófise de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Teleósteo). Morfologia e variações em relação com o ciclo ovário**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.
- FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zool. J. Linn. Soc.**, London, 72:297-353, 1981.
- FOLLÉNIUS, E.; DOERR-SCHOTT, J.; DUBOIS, M.P. Immunocytochemistry of pituitary cells from teleost fishes. **Int. Rev. Cytol.**, 54:193-233, 1978.
- FONTAINE, Y.A.; BURZAWA-GÉRARD, E. Esquisse de l'évolution des hormones gonadotropes e thyreotropes des vetébres. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 32:341-347, 1977.
- FUJIHARA, C.Y. **Dinâmica populacional de *Serrasalmus spilopleura*, Kner, 1860 no reservatório de Jurumirim (rio Paranapanema, SP): aspectos do crescimento, estrutura populacional, reprodução e nutrição**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil, 1997.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.P.; GARCÍA-AYALA, M.T.E.; AGULLEIRO, B. The adenohipophysis of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810): an immunocytochemical study. **Tissue & Cell**, 28:577-585, 1996.
- GAZOLA, R. **Histofisiologia das glândulas hipófise e interrenal. Dosagens plasmáticas de esteróides em fêmeas adultas de *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), Pices, Teleostei**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
- GODINHO, H.M.; FENERICH, N.A.; BASILE-MARTINS, M.A.; BARKER, J.M.B. Maturation curve of the ovary of *Pimelodus maculatus* Lac, (Siluroidei, Teleostei). **Bol. Inst. Pesca, São Paulo** 3(1):1-20, 1974.
- GODINHO, H.M.; BASILE-MARTINS, M.A.; FENERICH, N.A.; NARAHARA, N.Y. Fecundidade e tipo de desova do mandi, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces, Siluroidei). **Rev. Brasil. Biol.**, 37(4):737-744, 1977.
- GODOY, M.P. **Peixes do Estado de Santa Catarina, Florianópolis**. Editora da UFSC, co-edição Eletrosul/FURB, pp. 572, 1987.

- GRANDI, G.; COLOMBO, G.; CHICCA, M. Immunocytochemical studies on the pituitary gland of *Anguilla anguilla* L., in relation to early growth stages and diet-induced sex differentiation. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 131:66-76, 2003.
- GRIER, H.J. Celular Organization of the Testis and Spermatogenesis in Fishes. **Amer. Zool.**, 21:345-357, 1981.
- GRIER, H.J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L.D. & GRISWOLD, M.D. editors. **The Sertoli cell**. Clearwater, FL: Cache River Press. p.704-739, 1993.
- GRIER, H.J. Chordate Testis: The Extracellular Matrix Hypothesis. **J. Exp. Zool.**, 261:151-160, 1992.
- GRIER, H.J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). **J. Morphol.**, 243:265-281, 2000.
- GRIER, H.J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: CRESWELL, R.L. editor. **Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, November 2000. Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium, 537-552, 2002.
- GRIER, H.J.; LINTON, J.R.; LEATHERLAND, J.F.; De VLAMING, V. L. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. **Amer. J. Anat.**, 159:331-345, 1980.
- GRIER, H.J.; TAYLOR, R.G.; REESE, R.O. The mechanism of tubule elongation during testicular recrudescence in the redfish, *Sciaenops ocellatus* (Perciformes). **Proc. V Congr. Eur. Ichthyol., Stockholm**, 1985. KULLANDER, S.O.; FERNHOLM, B. editors. Stockholm: Swedish Museum of Natural History, p.258-291, 1987.
- GRIER, H.J.; van den HURK; BILLARD, R. Cytological identification of cells types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. **Cell Tissue Res.**, 257:491-496, 1989.
- GRIER, H.J.; TAYLOR, R.G. Testicular maturation and regression in the common snook. **J. Fish Biol.**, 53:521-542, 1998.
- GRIER, H.J.; LO NOSTRO, F. The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In: NORBERG, B.; KJESBU, O.S.; TARANGER, G.L.; ANDERSSON, E.; STEFANSSON, S.O. editors. **Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. Norway: University of Bergen. p.233-236, 2000.
- GURAYA, S.S. Recent advances in the morphology, histochemistry and biochemistry of steroid-synthesizing cellular sites in the testes of nonmammalian vertebrates. **Int. Rev. Cytol.**, 47: 99-136, 1976.
- HOAR, W.S. Reproduction. In: HOAR, W.S. & RANDALL, D.J. editors. **Fish Physiology**. New York: Academic Press. volume 111, chap.1, 1969.
- HOLMES, R.L.; BALL, J.N. The Pituitary Gland: A comparative Account. In: HARRISON, R.J.; MCMINN, R.M.H.; TREHERNE, J.E. editors. **Biological structure and function**. London: Cambridge Univ. Press, volume 4, 1-397, 1974.
- HOYER, P.E.; ANDERSEN, H. Histochemistry of 3β - hydroxysteroid dehydrogenase in rat ovary. **Histochemistry**, 51:167-193, 1977.

- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª. edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 488p., 2004.
- KIM, S.H.; RYU, H.; KANG, C.H.; KIM, S.Z.; SEUL, K.H.; CHO, K.W. Atrial Natriuretic Peptide Immunoreactivity in the Eggs of the Silkworm *Bombyx mori*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 94:151-156, 1994.
- KOIDE, Y.; NOSO, T.; SCHOUTEN, G.; PEUTE, J.; ZANDBERGEN, M.A.; BOGERD, J.; SCHULZ, R.W.; KAWAUCHI, H.; GOOS J.J.TH. Maturational gonadotropin from the African catfish, *Clarias gariepinus*: purification, characterization, localization, and biological activity. **Gen Comp. Endocrinol.**, 87:327-341, 1992.
- KOULISH, S.; KRAMER, C.R.; GRIER, H.J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **J. Morphol.**, 254:292-311, 2002.
- LAIZ-CARRIÓN, R.; SEGURA-NOGUERA, M.M.; MARTÍN DEL RÍO, M.P.; MANCERA, J.M. Ontogeny of adenohipophyseal cells in the pituitary of the American shad (*Alosa sapidissima*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 132:454-464, 2003.
- LAMAS, I.R.; GODINHO, A.L. Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a neotropical fish with an usual pattern of sexual maturity. **Environ. Biol. Fishes**, 45:161-168, 1996.
- LE GAC, F.; LOIR, M. Male Reproductive System, Fish. In: KNOBIL, E. & NEILL, J.D. editors. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press. volume 3, p.20-30, 1999.
- LO NOSTRO, F. **Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus*, Bloch, 1975 (Teleostei, Synbranchidae)**. Tesis Doctoral. Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Hemeroteca, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 2000.
- LO NOSTRO, F.; GRIER, H.; MEIJIDE, F.J.; GUERRERO, G.A. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. **Tissue & Cell**, 35:121-132, 2003a.
- LO NOSTRO, F.; GRIER, H.J.; ANDREONE, L.; GUERRERO, G.A. Involvement of the Gonadal Germinal Epithelium During Sex Reversal and Seasonal Testicular Cycling in the Protogynous Swamp Eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). **J. Morphol.**, 257:107-126, 2003b.
- LOIR, M. Interstitial cells from the testis of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vivo and in primary culture. **Cell Tissue Res.**, 261:133-144, 1990.
- LOIR, M.; MARGERIDON, A.; CAUTY, C. Leydig cells in *Myleus ternetzi* testes. **Aquat. Living Resour.**, 2:57-61, 1989.
- LOIR, M.; SOURDAINE, P.; MENDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C.; JÉGOU, B. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. **Microsc. Res. Tech.**, 32:533-552, 1995.
- LOIR, M.; LE GAC, F.; SOMARAKIS, S.; PAVLIDIS, M. Sexuality and gonadal cycle of the common dentex (*Dentex dentex*) in intensive culture. **Aquaculture**, 194:363-381, 2001.

- MARQUES, D.K.S.; ROSA, I.L.; GURGEL, H.C.B. Descrição histológica de gônadas de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. **Rev. Brasil. Zool.**, 17(3):573-582, 2000.
- MATTA, S.L.P.; VILELA, D.A.R.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinol.** 143:970-978, 2002.
- MATTEL, X. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. **J. Fish Biol.**, 43: 931-937, 1993.
- MCKEOWN, B.A.; VAN OVERBEEKE, A.P. Immunohistochemical identification of pituitary hormone producing cells in the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka* Walbaum). **Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.**, 112:350-362, 1971.
- MIURA, T.; MIURA, C.I. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. **Fish Physiol. Biochem.**, 28:181-186, 2003.
- MODESTO, T.; CANÁRIO, A.V.M. Morphometric changes and Sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 131:220-231, 2003.
- MORSE, H.C.; HELLER, C.G. Improvements in technique for the histochemical demonstration of 3β and 17β hydroxysteroid dehydrogenase in human testis. **Histochem.**, 35:331-339, 1973.
- MOYLE, P.B.; CECHE Jr, J.J. **Fishes: An Introduction to Ichthyology**. Third Edition, 1996.
- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M. editors. **Fish Physiology**. New York: Academic Press. volume IX, chap.6, 1983.
- NAITO, N.; HYODO, S.; OKUMOTO, N.; URANAO, A.; NAKAI, Y. Differential production and regulation of gonadotropins (GTH I and GTH II) in the pituitary gland of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. **Cell Tissue Res.**, 266:457-467, 1991.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001.
- NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 2nd. Ed. New York: Wiley-Interscience, 1994.
- NOMURA, H. **Aquicultura e Biologia de Peixes**. Nobel, São Paulo, pp.200, 1978.
- NOZAKI, M.; NAITO, N.; SWANSON, P.; MIYATA, K.; NAKAI, Y.; OOTA, Y.; SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 77:348-357, 1990a.
- NOZAKI, M.; NAITO, N.; SWANSON, P.; DICKHOFF, W.W.; NAKAI, Y.; SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 77:358-367, 1990b.

- NTIBA, M.J.; JACCARINI, V. Gonad maturation and spawning times of *Siganus sutor* off the Kenya coast: evidence for definite spawning seasons in a tropical fish. **J. Fish Biol.**, 37:315-325, 1990.
- OLIVEREAU, M.; NAGAHAMA, Y. Immunocytochemistry of gonadotropic cells in the pituitary of some teleost species. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 50:252-260, 1983.
- PAIVA, M.P. Sobre o controle da pirambema *Serrasalmus rhombeus* (L. 1766) Lacépède, 1803, no Açude Lima Campos (Icó, Ceará) através da pesca seletiva. **Rev. Brasil. Biol.**, 18:251-266, 1958.
- PARENTI, L.R.; GRIER, H.J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integr. Comp. Biol.** 44:333-348, 2004.
- PARREIRA, S.F. **Células Gonadotróficas de curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Pisces, Teleostei). Estudo Ultra-estrutural e Imunohistoquímico.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- PARREIRA, S.F. **Estudo Imunocitoquímico e Citoquímico das Células Gonadotróficas de curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881).** Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- PRASADA RAO, P.D. A comparative study of the pituitary gland of certain teleosts. **Acta Anat.** 73(2):281-303, 1969.
- PUDNEY, J. Comparative Cytology of the Non-mammalian Vertebrate Sertoli Cell. In: RUSSELL, L.D. & GRISWOLD, M.D. editors. **The Sertoli cell.** Clearwater, FL: Cache River Press. p.612-657, 1993.
- PUDNEY, J. Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. **Microsc. Res. Tech.**, 32:459-497, 1995.
- PUDNEY, J. Comparative Cytology of the Leydig Cell. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSEL, L.D. editors. **The Leydig Cell.** Vienna, IL: Cache River Press. p.98-142, 1996.
- REDDING, J.M.; PATIÑO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D.H. editor. **The physiology of fishes.** Boca Raton, FL: CRC Press. p.503-534, 1993.
- ROBERTS, S.B.; JACKSON, L.F.; KING, W.; TAYLOR, R.G.; GRIER, H.J.; SULLIVAN, C.V. Annual reproductive cycle of the common snook: endocrine correlates of maturation. **Trans. Am. Fish. Soc.**, 128:436-445, 1999.
- RUBAL, E.E.M.; BARACAT, I.; VAL-SELLA, M.V. Morfologia funcional da adeno-hipófise do cascudo, *Plecostomus albopunctatus* (Val., 1840). **Bol. Fisiol. Anim. Univ. S. Paulo**, 8: 119-130, 1984.
- RUBY, S.M.; MCMILLAN, D. Cyclical changes in the testes of the brook stickleback *Eucalia inconstans*. **J. Morphol.**, 131:465-477, 1970.
- SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R.; GODINHO, H.P.; SAMPAIO, E.V. Hipofiseação do *Pimelodus maculatus* (Pisces; Pimelodidae). In: **Congresso Brasileiro de Limnologia, São Carlos, 1997. Resumos.** São Carlos: Sociedade Brasileira de Limnologia, p.438, 1997.
- SCHREIBMAN, M.P.; MARGOLIS-KAZAN, H. The immunocytochemical localization of gonadotropin, its subunits and thyrotropin in the teleost *Xiphophorus maculatus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 39:467-474, 1979.

- SCHULZ, R.W. Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. **ARBS Annu. Rev. Biomed. Sci.**, 5:57-68, 2003.
- SCHULZ, R.W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiol. Biochem.**, 26:43-56, 2002.
- SCHULZ, R.W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L.R.; VILELA, D.A.R.; GODINHO, H.P. Sertoli cell proliferation in the adult testis – evidence from two fish species belonging to different orders. **Biol. Reprod.**, 73:891-898, 2005.
- SCOTT, A.P.; SUMPTER, J.P. Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 73:46-58, 1989.
- SHANBHAG, A.B.; NADKARNI, V.B. Histological and Histochemical Studies on the Testicular Cycle of a Fresh Water Teleost *Channa gachua* (Hamilton). **Anat. Anz.** 146:381-389, 1979.
- SUNDARARAJ, B.I. A Study on the Correlation between the Structure of the Indian Catfish *Heteropneustes* and the Seasonal Changes in the Ovary. **Acta. Anat.**, 37:47-80, 1959.
- SUNDARARAJ, B.I. **Reproductive Physiology of Teleost Fishes: A Review of Present Knowledge and Needs for Future Research.** Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 1981.
- TAYLOR, R.G.; GRIER, H.J.; WHITTINGTON, J.A. Spawning rhythms of common snook in Florida. **J. Fish Biol.**, 53:502-520, 1998.
- TELES, M.E.O.; GODINHO, H.P. Ciclo reprodutivo da pirambeba *Serrasalmus brandtii* (TELEOSTEI, CHARACIDAE) na represa de Três Marias, Rio São Francisco. **Rev. Brasil. Biol.**, 57(2):177-184, 1997.
- VAL-SELLA, M.V. **Hipófise de bagre – *Rhamdia hilarii* Vl. 1840. Estudo da anatomia e histologia da adenohipófise. Morfometria das células gonadotróficas em relação com o ciclo sexual.** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.
- VAL-SELLA, M.V. **Caracterização parcial das células gonadotróficas e da gonadotropina do curimatá (*Prochilodus scrofa* – Steindachner, 1881) no estágio repouso do ciclo gonadal.** Tese de Livre-Docência, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.
- VAL-SELLA, M.V.; SESSO, A. Thin section and freeze fracture studies of the hypophyseal proximal pars distalis in a teleost (*Rhamdia hilarii* Val.), during stages of reproductive cycle. **Cell Tissue Res.**, 208:433-444, 1980a.
- VAL-SELLA, M.V.; SESSO, A. Morphometric evaluation of the number of gonadotrophic cells of the teleost *Rhamdia hilarii* in the maturation, mature and spent stages of the gonadal cycle. **Acta Zool. (Stockholm)** 61:133-139, 1980b.
- VAL-SELLA, M.V.; FAVA-DE-MORAES, F.; BORGES FILHO, O.F.; CASTAGNOLLI, N. Morfologia funcional da adenohipófise e do “saccus vasculosus” do pacu (*Colossoma mitrei*) imaturo. I. A organização estrutural. **Bol. Fisiol. Anim. S. Paulo**, 10:165-175, 1986a.
- VAL-SELLA, M.V.; FAVA-DE-MORAES, F.; BORGES FILHO, O.F.; CASTAGNOLLI, N. Morfologia funcional da adenohipófise e do “saccus vasculosus” do pacu (*Colossoma*

- mitrei*) imaturo. II. A atividade gonadotrópica em variação ambiental. **Bol. Fisiol. Anim. S. Paulo**, 10:155-164, 1986b.
- VAN DEN HURK, R.; PEUTE, J.; VERMEIJ, J.A.J. Morphological and Enzyme Cytochemical Aspects of the Testis and Vas deferens of the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. **Cell Tissue Res.**, 186:309-325, 1978.
- VAN OORDT, PG.W.J.; PEUTE, J. The cellular origin of pituitary gonadotropins in teleosts. In: HOAR, W.S; RANDALL, D.J; DONALDSON, E.M. editors. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, volume 9 A, 1983.
- VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos. Teoria e Prática**. EDUEM, Maringá, 1996.
- VILELA, D.A.R.; SILVA, S.G.B.; PEIXOTO, M.T.D.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. Spermatogenesis in teleost: insights from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiol. Biochem.**, 28:187-190, 2003.
- WELTZIEN, F.A.; ANDERSSON, E.; ANDERSEN, O.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; NORBERG, B. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). **Comp. Biochem. Physiol.**, A 137:447-477, 2004.
- YARON, Z. Demonstration of 3β – Hydroxysteroid Dehydrogenase in the testis of *Tilapia mossambica* (Cichlidae, Teleostei). **J. Endocrin.**, 34:127-128, 1966.

CAPÍTULOS

Os capítulos apresentados são esboços de artigos científicos. Dessa forma, cada capítulo será posteriormente modificado e sintetizado a fim de atender às exigências para publicação em revistas de Qualis A.

Capítulo 1

- “Morfologia testicular e o epitélio germinativo durante a espermatogênese contínua de *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes: Characidae)”.
- “Ultra-estrutura e atividade enzimática (3β -HSD e fosfatase ácida) das células de Leydig durante a espermatogênese contínua de *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes: Characidae).”

Capítulo 2

- “Alterações histomorfométricas do epitélio germinativo, proliferação das células de Sertoli e atividade 3β -HSD durante a espermatogênese descontínua de *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae).”

Capítulo 3

- “Imuno-histoquímica das células produtoras de FSH e LH durante a espermatogênese contínua de *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes: Characidae) e descontínua de *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae).”

CAPÍTULO 1

MORFOLOGIA TESTICULAR E O EPITÉLIO GERMINATIVO DURANTE A ESPERMATOGÊNESE CONTÍNUA DE *SERRASALMUS SPILOPLEURA* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE).

Resumo

O testículo de *Serrasalmus spilopleura* é do tipo tubular anastomosado, no qual o compartimento germinativo forma alças e túbulos que se interconectam por toda extensão testicular. Durante o ciclo reprodutivo, duas regiões são nítidas no testículo: cortical, altamente ramificada com luz ampla e repleta de espermatozóides; e medular, com poucas ramificações e luz pouco nítida. A produção espermatogênica ocorre nas regiões medular e cortical enquanto que o armazenamento de espermatozóides é exclusivo da região cortical. Essa anatomia é condizente a reprodução contínua, na qual os espermatozóides são produzidos e liberados constantemente durante o ciclo reprodutivo. O epitélio germinativo de *S. spilopleura* é constituído por cistos, formados por células germinativas, em desenvolvimento sincrônico, envoltas pelas células de Sertoli. A espermatogênese ocorre no interior dos cistos e durante suas principais fases, as células germinativas e as células de Sertoli passam por modificações morfológicas que indicam o estado e a funcionalidade do epitélio germinativo (contínuo e descontínuo). Reporta-se o epitélio germinativo estratificado; com cistos basais de espermatogônias, e cistos apicais de células germinativas em desenvolvimento mais avançado. A estratificação associada à intensa proliferação espermatogonial são estratégias para manter a produção de espermatozóides contínua durante o ciclo reprodutivo. A proliferação das células de Sertoli também foi documentada. A proliferação das células de Sertoli é separada temporalmente e espacialmente da proliferação espermatogonial; as células de Sertoli proliferam antes das espermatogônias, a fim de garantir um número adequado para acompanhar e acomodar o crescimento dos cistos durante a espermatogênese.

Introdução

Durante os últimos cinquenta anos, a morfologia gonadal dos peixes teleósteos tem sido utilizada para descrever ciclos reprodutivos anuais, primeira maturação sexual, ritmos de desova, fecundidade e outros aspectos de interesse ao cultivo e conservação das espécies. Na literatura, as descrições sobre a estrutura testicular são escassas, muitas vezes confusas e com o uso indiscriminado dos termos “lóbulo” e “túbulo” (Grier et al., 1980; Grier, 1981; Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004). Após examinar uma série de morfologias testiculares, Grier (1993) redefiniu a terminologia e classificou o testículo dos peixes em dois tipos (tubular anastomosado e lobular), conforme a organização do compartimento germinativo na periferia do órgão. Dessa forma, a morfologia gonadal dos peixes teleósteos tem sido reclassificada e agrupada em um banco de estruturas testiculares (Parenti & Grier, 2004), no qual, o grupo Ostariophysi, com 75% das espécies de peixes de água doce do mundo (Fink & Fink, 1981), representa apenas 5,8% das 136 descrições existentes (Parenti & Grier, 2004).

Nos peixes, a unidade morfofisiológica da espermatogênese é o espermatocisto, ou cisto, formado por células germinativas, em desenvolvimento sincrônico, envoltas perifericamente pelo citoplasma das células de Sertoli (Grier 1993; Pudney, 1993; Loir et al., 1995; Le Gaac & Loir, 1999; Callard & Callard, 1999). A sobrevivência das células germinativas depende da sua associação com as células de Sertoli, responsáveis por criar um microambiente favorável e propício para o desenvolvimento da espermatogênese (Shulz et al., 2005).

Recentemente, o epitélio germinativo dos peixes foi redefinido (Grier & Lo Nostro, 2000; Grier 2002) e readequado para incorporar os conceitos histológicos de um tecido epitelial. O epitélio germinativo permite definir cinco classes reprodutivas (regredido, maturação inicial, intermediária, final e regressão) durante o ciclo reprodutivo dos Perciformes; *Centropomus undecimalis* (Grier & Taylor, 1998), *Rachycentron canadum* (Brown-Peterson et al., 2002); *Cynoscion nebulosus* (Brown-Peterson & Warren, 2003); *Padogobius martensi* (Cinquetti & Dramis, 2003) e dos Synbranchiformes; *Synbranchus marmoratus* (Lo Nostro et al., 2003a), com base na alternância do epitélio germinativo entre contínuo e descontínuo e nos estágios de desenvolvimento das células germinativas.

O epitélio germinativo contínuo é formado por cistos que se distribuem ao longo de toda a membrana basal (Grier, 2002). A forma descontínua resulta da espermição (liberação dos espermatozoides para o lúmen) e da não reposição imediata das células germinativas, o que gera trechos de células de Sertoli entremeados por isolados e dispersos cistos de espermatogônias (Grier, 2002). Em teleósteos de testículo tubular anastomosado, as alterações do epitélio germinativo foram documentadas apenas para *Pseudoplatystoma fasciatum* (Siluriformes: Pimelodidae) (Batlouni et al., 2006). Além disso, não existem dados sobre a dinâmica do epitélio germinativo em espécies de reprodução contínua, cuja produção de espermatozoides é constante durante todo ciclo reprodutivo (espermatogênese contínua).

Nos teleósteos adultos, a proliferação das células de Sertoli tem sido documentada por vários pesquisadores (Billard, 1969; Grier, 1993; Koulisch et al., 2002; Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2003; Lo Nostro et al., 2003a; Chaves-Pozo et al., 2005; Schulz et al., 2005). Nas espécies estudadas, as células de Sertoli proliferam, em maior frequência, quando associadas à espermatogônias, embora também possam se dividir em cistos de espermatócitos (Billard, 1969; Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005) e de spermátides (Koulisch et al., 2002; Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005). Em peixes de testículo tubular anastomosado, não existem dados sobre a proliferação das células de Sertoli durante a espermatogênese, com exceção do bagre africano, *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae) (Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2005).

Serrasalmus spilopleura (Kner, 1859) (Ostariophysi, Characiformes, Characidae), conhecida como pirambeba, é uma espécie de boa adaptação a ambientes lênticos (Leão, 1996; Schleser, 1997). Não é migradora e encontra-se nos principais reservatórios brasileiros, onde sua reprodução é contínua (recrutamento constante de jovens na população) e mais frequente nas épocas de chuvas (Lamas & Godinho, 1996; Fujihara, 1997; Teles & Godinho, 1997).

O presente trabalho teve como principais objetivos: descrever a estrutura testicular de *S. spilopleura*; analisar a dinâmica do epitélio germinativo, com base na histologia e na ultra-estrutura das células germinativas e das células de Sertoli e verificar os processos de proliferação e morte celular durante a cinética da espermatogênese.

Material e Métodos

Os animais

Machos adultos de *S. spilopleura* foram coletados, mensalmente, no rio Piracicaba (Município de Santa Maria da Serra, Estado de São Paulo, Brasil), durante o período de novembro de 2003 a abril de 2005, somando ao todo 65 exemplares. Os animais foram anestesiados com 0,1% de benzocaína, pesados e seus comprimentos mensurados. Em seguida, os animais foram sacrificados por decapitação e seus testículos rapidamente removidos, pesados e imersos em solução de 2% glutaraldeído e 4% paraformaldeído, em tampão fosfato Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas para as diferentes metodologias empregadas. Animais na mesma faixa de comprimento foram considerados para o cálculo do índice gonadossomático ($IGS = [\text{peso das gônadas/peso total do animal}] \times 100$). Os valores do IGS são apenas descritivos, sem nenhuma análise estatística apropriada. Os procedimentos adotados estão de acordo com o Comitê de Ética Animal e IBAMA.

Histologia

O material fixado foi desidratado, infiltrado e incluído em resina Technovit 7100 (Jung HistoResin). Cortes transversais, longitudinais e seriados de 3µm foram obtidos e corados em Hematoxilina Férrica/Eosina, Azul de Toluidina/Bórax e PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow (Quintero-Hunter et al., 1991). A anatomia testicular foi fotografada e as secções histológicas analisadas e documentadas através de sistema computadorizado para análise de imagens (Leica Qwin 2.5).

Microscopia eletrônica de transmissão e varredura

Fragmentos de testículos fixados foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (no mesmo tampão, 0,1M a pH 7,2) por 2h no escuro, contrastados em bloco com solução aquosa de 5% de uranila por 2 horas, desidratados e embebidos em araldite. Os testículos foram seccionados, contrastados em solução saturada de acetato de uranila em 50% de álcool e citrato de chumbo e documentados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips – CM 100. Alguns exemplares também foram processados para microscopia

eletrônica de varredura. Assim, o material fixado foi desidratado, submetido ao ponto crítico com CO₂ e metalizado em ouro, conforme rotina de preparação de materiais para essa metodologia. Os testículos foram documentados em microscópio eletrônico de varredura Phillips – SEM 515.

Citoquímica ultra-estrutural (Soares, 1998)

O material fixado foi lavado em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) e tampão imidazol 0,1M (pH 7,5), pós-fixado em 2% de tetróxido de ósmio (no mesmo tampão imidazol) por 30 min no escuro, contrastado em bloco com solução aquosa de 0,5% de uranila por 1h, desidratado, embebido em araldite, seccionado e pós-contrastado em solução saturada de uranila em 50% de álcool e citrato de chumbo. Os testículos foram documentados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips – CM 100. Os cortes semi-finos também foram examinados e eletromicrografados.

PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

O PCNA é altamente conservado (ver Chieffi et al., 2001) e considerado o marcador mais utilizado para se detectar proliferação celular nos testículos dos vertebrados, tais como: peixes - *Anguilla japonica* (Miura et al., 1999; Miura et al., 2002), *S. marmoratus* (Lo Nostro et al., 2003); anfíbios - *Cynops pyrrhogaster* (salamandras) (Yazawa et al., 2000); répteis - *Podarcis s. sicula* (lagartixas) (Chieffi et al., 2001); e mamíferos (Kang et al., 1997). Fragmentos de testículos de *S. spilopleura* foram fixados em formalina tamponada ou Bouin, processados em parafina, seccionados, desparafinizados e preparados para reação imuno-histoquímica do PCNA conforme as especificações do fabricante (Novocastra – NCL-PCNA). Como controle negativo, algumas lâminas tiveram o anticorpo primário omitido e substituído por TBS.

Deteção in situ da fragmentação de DNA (TUNEL)

A identificação in situ das células apoptóticas foi realizada pelo método de TUNEL, com o kit comercial TdT – FragEL™ – DNA Fragmentation Detection Kit (Cat # QIA33). Fragmentos de testículos foram fixados em formalina tamponada, desidratados, infiltrados

em parafina, seccionados, desparafinizados e conduzidos à reação do TUNEL conforme especificações do fabricante. Como controle negativo, algumas lâminas tiveram a reação de mistura omitida e substituída por TBS.

Resultados

Estrutura Testicular

Os testículos de *S. spilopleura* são pares, alongados e de contorno irregular (Fig. 1A,B). Estão presos à cavidade celomática através de uma extensão dorsal de tecido conjuntivo (mesórquio) formado principalmente por vasos sanguíneos e gordura perigonadal (Fig. 1A-C,E-H). O ducto espermático resulta da fusão dorsal dos ductos testiculares principais (de cada testículo) e exterioriza-se, caudalmente, por meio da papila urogenital (Fig. 1A-C). O ducto testicular principal é dorsal (Fig. 1D,2) e surge pela confluência do compartimento germinativo na porção caudal do órgão (Fig. 1D). O testículo de *S. spilopleura* é achatado ventro-lateralmente, o que lhe confere aspecto triangular nos cortes transversais (Fig. 1E-H). Secções em diferentes alturas do órgão (Fig. 1C) revelam que o testículo de *S. spilopleura* afila-se em suas extremidades (Fig. 1E,H) e é constituído por duas regiões, uma cortical, com alças e túbulos ramificados, de luz ampla e repleta de espermatozóides; e uma região medular, com poucas ramificações e luz menos nítida (Fig. 1E-H). Essa organização é evidente nas secções medianas como mostra a Figura 1F. O compartimento germinativo organiza-se na periferia do testículo em forma de alças e túbulos altamente ramificados, que se interconectam por toda extensão do órgão (Fig. 1I). Alças e túbulos transversais e longitudinais são observados na Figura 1I. Essas características indicam que a estrutura testicular é do tipo tubular anastomosado. Os testículos de *S. spilopleura* são revestidos externamente por uma cápsula, constituída por mesotélio e tecido conjuntivo frouxo subjacente (Fig. 1J). Internamente, o testículo é dividido em dois compartimentos, o germinativo e o intersticial (Fig. 1J), que são separados por uma membrana basal. O compartimento germinativo é revestido pelo epitélio germinativo (células germinativas e células de Sertoli) (Fig. 1J) enquanto que o compartimento intersticial é uma continuação da cápsula, com tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, células de Leydig e outros componentes (Fig. 1J).

Células germinativas

Durante a fase de proliferação espermatogonial, o epitélio germinativo é contínuo e formado por cistos de espermatogônias (primárias e secundárias) (Fig. 2A-C). A proximidade do epitélio gera constrições na luz do compartimento germinativo (Fig. 2A). No entanto, os prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli evitam a obliteração total da luz do compartimento germinativo (Fig. 2A). O epitélio germinativo é separado do compartimento intersticial por uma lâmina basal pregueada (Fig. 2D). As espermatogônias primárias (ou do tipo A) são as maiores células da linhagem germinativa. Estão envoltas completamente pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (Fig. 2E). Em uma secção transversal, é possível contar pelo menos cinco células de Sertoli envolvendo uma única espermatogônia (Fig. 5A). As espermatogônias primárias possuem núcleo volumoso, central ou excêntrico, com cromatina homogeneamente descondensada e nucléolo de componentes fibrilar e granular evidentes (Fig. 2A,B,E,F). O envoltório nuclear é irregular (Fig. 2A,B,E) e dotado de muitos complexos de poros (Fig. 2G,H). O citoplasma das espermatogônias primárias tem grande quantidade de ribossomos e suas mitocôndrias são arredondadas e de elétrons-densidade moderada (Fig. 2B,E-H). O sistema de endomembranas é desenvolvido; com complexo de Golgi e vesículas abundantes e retículo endoplasmático rugoso alongado e disperso (Fig. 2G). As “lamellae anulata” não foram encontradas. Nas espermatogônias primárias, as “nuages” (material elétron-denso) concentram-se ao redor dos poros do envoltório nuclear (Fig. 2H) ou associam-se a grupos de mitocôndrias (Fig. 2D,E,H).

As espermatogônias primárias dão origem às espermatogônias secundárias (ou do tipo B) que estão conectadas por pontes citoplasmáticas devido à citocinese incompleta (Fig. 2L,M). As espermatogônias secundárias sofrem sucessivas divisões mitóticas (Fig. 2I) antes de originar os espermatócitos primários. Durante a divisão dos cromossomos (Fig. 2I), as espermatogônias secundárias possuem mitocôndrias densas e alongadas que podem se fundir (Fig. 2J), e pontes citoplasmáticas com reforço de membranas (Fig. 2K). A cada divisão, as espermatogônias secundárias tornam-se menores que as iniciais, com núcleo ovóide/arredondado, cromatina heterogeneamente difusa e nucléolo central (Fig. 2L). O citoplasma tem poucas “nuages” e as mitocôndrias são alongadas, densas e em menor

quantidade (Fig. 2L,M). O complexo de Golgi e uma grande quantidade de vesículas concentram-se ao redor das pontes citoplasmáticas, o que confere certa polaridade à célula (Fig. 2L,M). Os centríolos também se localizam próximos às pontes citoplasmáticas e um dos seus elementos ancora-se na membrana plasmática e pode originar um cílio curto (Fig. 2M). As pontes citoplasmáticas possuem bordas elétrons-densas e permitem o trânsito de vesículas e organelas pelo seu interior (Fig. 2M).

Com o início da meiose, os cistos aumentam de volume e projetam-se para luz do compartimento germinativo (Fig. 3A,B,C,D). O epitélio germinativo é contínuo e formado por cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes (Fig. 3C,D). Os espermatócitos I estão conectados por pontes citoplasmáticas (Fig. 3E,K) e são identificados na prófase pela compactação da cromatina e pela formação do complexo sinaptonêmico (Fig. 3E-I). Os espermatócitos I em zigóteno possuem núcleo central, cromatina heterogênea e os elementos laterais do complexo sinaptonêmico formam-se a partir do envoltório nuclear (Fig. 3E,F). O citoplasma contém poucas “nuages”, mitocôndrias densas e alongadas e o complexo de Golgi juntamente com vesículas e os centríolos concentram-se ao redor das pontes citoplasmáticas (Fig. 3E,F). Durante a prófase, os centríolos duplicam-se e um elemento de cada par pode ancorar-se na membrana plasmática e originar um cílio curto (Fig. 3K-M). Nos espermatócitos I em paquíteno, o elemento central do complexo sinaptonêmico é formado e os cromossomos tornam-se mais compactados (Fig. 3H,J). Após facilitar as trocas genéticas, o complexo sinaptonêmico desaparece e os cromossomos movem-se para a periferia do núcleo (Fig. 3I). Ao final da diacinese, o envoltório nuclear fragmenta-se e os cromossomos são liberados no citoplasma para prosseguirem com a metáfase, anáfase e telófase da meiose I (Fig. 3G). A meiose é sincrônica, porém, espermatócitos em prófase e metáfase são observados em um mesmo cisto (Fig. 3G). Os espermatócitos II, resultantes da primeira divisão meiótica, entram rapidamente em meiose II e originam as espermatídes.

As espermatídes iniciais apresentam cromatina heterogeneamente condensada e citoplasma com algumas mitocôndrias (Fig. 3J). Seu diâmetro nuclear é praticamente a metade do diâmetro nuclear dos espermatócitos I em paquíteno (espermatócito I em paquíteno = $6,2\mu\text{m}$, espermatíde inicial = $3,4\mu\text{m}$) (Fig. 3J). O epitélio germinativo é ainda

contínuo, porém com cistos basais de espermatogônias e apicais de células germinativas em desenvolvimento mais avançado (Fig. 4A). As espermatídes são encontradas em diferentes estágios da espermiogênese (Fig. 4A). Estão conectadas por pontes citoplasmáticas e possuem núcleo central ou excêntrico (Fig. 4A) com cromatina que varia de heterogênea à filamentosa com áreas elétron-lúcidas (Fig. 4A-F). Na espermiogênese, o centríolo distal origina o flagelo; o complexo centriolar migra em direção ao núcleo e leva o flagelo em crescimento; o núcleo rotaciona-se perpendicularmente aos centríolos e forma uma leve depressão na altura do complexo centriolar (Fig. 4A-E). Os espermatozóides apresentam cabeça (sem acrossomo, cromatina filamentosa com áreas elétron-lúcidas), peça intermediária (com mitocôndrias elétron-densas e vesículas que se interconectam à membrana plasmática) e cauda (flagelo levemente excêntrico ao núcleo com expansões laterais de membrana) (Fig. 4M,N).

A espermição consiste na liberação dos espermatozóides para a luz do compartimento germinativo (Fig. 4G). Nesse processo, orifícios revestidos por membrana e de diferentes tamanhos surgem na parte apical nas células de Sertoli (Fig. 4G-J). Os orifícios são decorrentes da fusão de vesículas citoplasmáticas com a membrana plasmática das células de Sertoli (Fig. 4I,J). Inicialmente, a fusão gera um rendilhado que evolui para aberturas maiores, por onde saem os espermatozóides (Fig. 4H-J). O epitélio germinativo descontínuo é resultado da espermição com a não renovação imediata das células germinativas, o que gera trechos de células de Sertoli entremeados por poucos e dispersos cistos de espermatogônias (Fig. 4K).

Células de Sertoli

Durante a espermatogênese, uma única célula de Sertoli pode ser recrutada e participar da formação de mais de um tipo de cisto (Fig. 5A,B). Células de Sertoli elétron-densas e elétron-lúcidas podem fazer parte de um mesmo cisto (Fig. 5A). As células de Sertoli apresentam prolongamentos citoplasmáticos para o interior dos cistos (Fig. 5B) e estão conectadas lateralmente através de complexos juncionais (junção de oclusão, adesão, desmossomos) (Fig. 5C,D) e interdigitações (Fig. 2F). Apoiam-se sobre uma lâmina basal (Fig. 2D) e possuem citoplasma com sistema de endomembranas desenvolvido, o que inclui

vesículas (Fig. 5G), complexo de Golgi (Fig. 5F), vesículas de transcitose (Fig. 5E), vesículas revestidas por clatrina (Fig. 5C) e retículo endoplasmático liso (Fig. 5F) e rugoso (Fig. 5G). Os centríolos das células de Sertoli estão localizados próximos ao sistema de endomembranas (Fig. 5F) e suas mitocôndrias são arredondadas e alongadas (Fig. 5E-G,K). Durante a espermatogênese, inclusões lipídicas, evidenciadas por microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 5A,G) e pelo método do ósmio-imidazol (Fig. 5H,12) também foram encontradas nessas células. Uma grande quantidade de vesículas concentra-se ao redor das inclusões lipídicas (Fig. 5G). As células de Sertoli emitem prolongamentos citoplasmáticos em direção à luz e fagocitam espermatozóides residuais (Fig. 5G,J,L). Fagossomos e corpos residuais são as evidências morfológicas da fagocitose (Fig. 5A,B,I,J,L). Fragmentos celulares resultantes da apoptose de células germinativas também são fagocitados pelas células de Sertoli (Fig. 5I). No epitélio germinativo descontínuo, as células de Sertoli apresentam citoplasma com retículo endoplasmático liso, mitocôndrias arredondadas e alongadas, fagossomos (Fig. 5J-L) e grande quantidade de inclusões lipídicas (Fig. 12C). Células de Sertoli com citoplasma denso, vacuolizado e com figuras de mielina também são observadas no epitélio descontínuo (Fig. 5J).

Cinética do epitélio germinativo

Inicialmente, o epitélio germinativo é contínuo e constituído por dois estratos: basal, formado exclusivamente por cistos de espermatogônias, e apical, com cistos de células germinativas em desenvolvimento mais avançado (Fig. 6A). Pela coloração empregada (Hematoxilina+PAS+Metanil Yellow), as espermatogônias do estrato basal podem ser claras ou escuras (Fig. 6A). A maioria das espermatogônias basais compromete-se com o processo da espermatogênese e origina cistos de espermatócitos (Fig. 6B,C). O epitélio germinativo cresce em altura e chega a reduzir a luz do compartimento germinativo (Fig. 6B). A maturação e a espermiação dos cistos apicais (Fig. 6C,D) resulta em um epitélio contínuo e formado por uma monocamada de cistos (principalmente por espermatócitos) (Fig. 6C,D). Com a liberação dos espermatozóides, a luz do compartimento germinativo torna-se ampla (Fig. 6C,D). Algumas espermatogônias são encontradas por baixo dos cistos de espermatócitos, porém ainda insuficientes para formar um estrato basal (Fig. 6C,D).

Com o progresso da espermatogênese, os espermatócitos originam espermátides, que se tornam predominantes no epitélio (Fig. 6E,F). Em alguns trechos do epitélio germinativo, as espermatogônias basais proliferam e chegam a formar um estrato abaixo dos cistos de espermátides (Fig. 6E,G,H). Nas regiões em que o epitélio germinativo possui um estrato basal, a espermição dos cistos apicais não gera descontinuidade, mas sim um epitélio contínuo e formado por uma monocamada de cistos de espermatogônias (Fig. 4L,6G, 7A,B,E). A intensa proliferação dessas espermatogônias é comprovada por uma série de figuras mitóticas (Fig. 7A,F). Dessa maneira, o epitélio germinativo é capaz de produzir espermatozóides durante todo o ciclo reprodutivo (espermatogênese contínua). Nos trechos em que o epitélio germinativo não apresenta um estrato basal (Fig. 6F), a espermição resulta em um epitélio germinativo descontínuo (Fig. 6H). As descontinuidades são mais freqüentes na região cortical do testículo (Fig. 7C,D). O epitélio descontínuo pode ser formado por células de Sertoli entremeadas por cistos isolados de espermatogônias (Fig. 7D) ou apenas por células de Sertoli (Fig. 7G,H). Fagossomos (Fig. 7D-H) e vacuolizações PAS positivas (Fig. 7E,F) são intensas nas células de Sertoli dos epitélios descontínuos. Epitélio contínuo estratificado, contínuo constituído por monocamada de cistos e descontínuo coexistem no testículo de *S. spilopleura* (Fig. 7B,G).

Ciclo reprodutivo

Durante o ciclo reprodutivo, o testículo de *S. spilopleura* apresenta todos os tipos de células germinativas, o que resulta na produção constante de espermatozóides. A quantidade de espermatozóides é variável e reflete-se no índice gonadossomático (IGS). Apesar dos valores de IGS não apresentarem amostragem adequada (Fig. 8), identificam-se dois grupos de desenvolvimento testicular; um correspondente ao período em que o IGS não oscila (Fig. 9); e outro, em que o IGS apresenta-se elevado (Fig. 10). No período em que o IGS não varia, o testículo possui duas regiões nítidas: uma medular (espermatogênica) e uma cortical (espermatogênica e de armazenamento) (Fig. 9A). A região medular tem poucas ramificações e possui epitélio germinativo contínuo com predominância de espermatócitos e espermátides (Fig. 9C). Na região cortical, a luz é ampla e repleta de espermatozóides (Fig. 9A), com epitélio germinativo: contínuo e

estratificado (Fig. 9B), ou com poucas descontinuidades e luz irregular (Fig. 9D). Nos testículos de IGS elevado (Fig. 10), a região cortical é mais desenvolvida e apresenta luz larga e repleta de espermatozóides (Fig. 10A). Nessa região, o epitélio é predominantemente descontínuo (Fig. 10C,D), porém alguns trechos de epitélio contínuo (sem estratos basais) também são documentados (Fig. 10C). A região medular possui epitélio germinativo pouco estratificado (com predominância de espermátides) e epitélio descontínuo (Fig. 10B).

PCNA e TUNEL

Durante a fase de proliferação espermatogonial, a imunomarcção ao PCNA ocorre nos núcleos das espermatogônias (Fig. 11A). Figuras mitóticas de espermatogônias também são observadas (Fig. 11A inset). Nessa fase, as células de Sertoli não proliferam (Fig. 11A). Com o início da meiose, os cistos tornam-se volumosos e a marcação ao PCNA concentra-se nos núcleos das espermatogônias e dos espermatócitos (Fig. 11B). As células de Sertoli não proliferam em cistos de espermatócitos e espermátides (Fig. 11B). As espermatogônias basais proliferam e formam um estrato basal em alguns trechos do epitélio germinativo contínuo (Fig. 11C). Nas regiões em que o estrato basal é ausente, a espermição gera um epitélio germinativo descontínuo (Fig. 11D). As descontinuidades (frequentes na periferia do testículo) são formadas por células de Sertoli entremeadas por cistos de espermatogônias, que podem ou não responder ao PCNA (Fig. 11D-G). Marcação citoplasmática também são encontradas no citoplasma das espermatogônias (Fig. 11D). No epitélio descontínuo, as células de Sertoli proliferam: (1) quando não pertencem a nenhum cisto (Fig. 11F) ou (2) em associação à cistos de espermatogônias, que em geral, não respondem ao PCNA (Fig. 11E,G).

Quanto ao TUNEL, as apoptoses ocorrem em todos os tipos de células germinativas, em especial, nos espermatócitos e espermátides (Fig. 12D,E). Essa observação é qualitativa e estudos morfométricos são necessários para confirmá-la. Apoptoses de células de Sertoli e de células intersticiais não foram encontradas. Os fragmentos resultantes das apoptoses das células germinativas são fagocitadas pelas células de Sertoli (Fig. 5I,12F).

A cinética do epitélio germinativo de *S. spilopleura*, bem como os períodos de proliferação (células de Sertoli e espermatogônias) estão resumidamente ilustrados na Figura 13.

Discussão

Estrutura Testicular

O testículo dos vertebrados é classificado em três tipos (tubular anastomosado, lobular e tubular) conforme a organização do compartimento germinativo na periferia do testículo (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004). No testículo tubular anastomosado, o compartimento germinativo é formado por alças e túbulos ramificados que se interconectam da periferia até o ducto testicular principal. Essa estrutura ocorre apenas nos osteichthyes basais, em que se incluem os teleósteos mais basais (como os Ostariophysi) (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004). O testículo lobular é caracterizado por apresentar compartimento germinativo em formato digitiforme (com fundo cego) na periferia ventro-lateral do testículo. Ocorre nos Neoteleostei (como Atherinomorpha e Percomorpha) e nos anfíbios (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004). Nos testículos tubulares, o compartimento germinativo forma alças, que se estendem da periferia até a rete testis. Esse último tipo ocorre em répteis, aves e mamíferos (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004). Na dependência da distribuição das espermatogônias, os testículos lobulares podem ser: (1) restritos, como os dos Atherinomorpha, em que espermatogônias ficam confinadas na porção distal dos lóbulos, ou (2) irrestritos, como nos Percomorpha e anfíbios, em que as espermatogônias estão distribuídas ao longo de todo o lóbulo (Grier, 1993; Grier & Parenti, 2004).

Com base nas redefinições, a morfologia gonadal dos peixes teleósteos tem sido reclassificada e agrupada em um banco de estruturas testiculares (Parenti & Grier, 2004), no qual das 136 descrições, 58% correspondem à série Atherinomorpha (lobular restrito) e 23% à Percomorpha (lobular irrestrito). Os Ostariophysi, com 75% das espécies de peixes de água doce do mundo (Fink & Fink, 1981), detêm apenas 5,8% das descrições e são representados pelas ordens Cypriniformes, família Cyprinidae (*Abbottina rivularis*, *Barbus kahajantii*, *Danio rerio*, *Notemigonus crysoleucas* e *Notropis hyselepterus*) (tubular anastomosado); ordem Characiformes, família Characidae (*Gymnocorymbus ternetzi*)

(tubular anastomosado); ordem Siluriformes, incertis sedis (*Conorhynchus conirostris*) (tubular anastomosado) e Ictaluridae (*Ictalurus natalis*) (tubular anastomosado) (Parenti & Grier, 2004). Através das observações comparativas, Parenti e Grier (2004) propõem que a estrutura do tipo tubular anastomosado é mais primitiva em relação à lobular, que é considerada como a mais derivada dentro do grupo dos peixes. A transição de uma estrutura para outra é explicada através da evolução pedomórfica dos teleósteos (Parenti & Grier, 2004; Thacker & Grier, 2005), em que os peixes adultos mais derivados retêm as características de desenvolvimento inicial dos peixes primitivos. Os pesquisadores (Parenti & Grier, 2004) acreditam que o testículo lobular é resultado da expansão do compartimento germinativo associado à mudança na síntese da matriz extracelular (Grier, 1992) durante as etapas iniciais do ciclo reprodutivo de um teleósteo de testículo tubular anastomosado. Parenti e Grier (2004) endossam a importância da estrutura testicular como ferramenta para compreender a evolução dos padrões de morfologia gonadal e que as características testiculares podem ser usadas em análises filogenéticas. A estrutura testicular de *S. spilopleura* atende as expectativas de Grier (1993). É do tipo tubular anastomosado, com compartimento germinativo em forma de alças e túbulos que se interconectam por toda extensão do testículo. No entanto, duas regiões são nítidas: uma cortical, mais ramificada com luz ampla e repleta de espermatozóides; e outra medular, menos ramificada e luz pouco nítida. A região medular é espermatogênica (produção), enquanto que a cortical é espermatogênica, porém principalmente de estocagem de espermatozóides. As áreas de produção e estoque são recrutadas continuamente durante o ciclo reprodutivo. Esse padrão é condizente ao modelo de reprodução contínua, na qual os espermatozóides são produzidos constantemente durante o ciclo reprodutivo.

Epitélio germinativo e a espermatogênese

Atualmente a redefinição do epitélio germinativo tem sido aplicada para vários teleósteos; *Centropomus undecimalis* (Perciformes) (Grier & Taylor, 1998), *Cynoscion nebulosus* (Perciformes) (Brown-Peterson & Warren, 2001), *Rachycentron canadum* (Perciformes) (Brown-Peterson et al., 2002), *Thalassoma bifasciatum* (Perciformes) (Koulish et al., 2002), *Synbranchus marmoratus* (Synbranchiformes) (Lo Nostro et al.,

2003a, b), *Padogobius martensi* (Perciformes) (Cinquetti & Dramis, 2003) e em *Pseudoplatystoma fasciatum* (Siluriformes) (Batlouni et al., 2006). Os critérios supracitados também se aplicam ao epitélio germinativo de *S. spilopleura*.

Nos peixes, a espermatogênese ocorre no interior de cistos, que são constituídos por células germinativas, em desenvolvimento sincrônico, envoltas pelo citoplasma das células de Sertoli (Grier 1993; Pudney, 1993; Pudney, 1995; Loir et al., 1995; Le Gaac & Loir, 1999; Callard & Callard, 1999). A espermatogênese e as características citoplasmáticas e nucleares das células germinativas estão descritas para vários peixes teleósteos (ver revisão em Pudney, 1995; Guraya, 2001; Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999; Negrão et al., 2002; Gusmão et al., 2002; Lo Nostro et al., 2003b; Koulis et al., 2003; Fishelson, 2003; Meijide et al., 2005; Fishelson et al., 2006; Batlouni et al., 2006). Os dados encontrados em *S. spilopleura* são semelhantes aos da literatura e permitem definir marcadores citoplasmáticos e nucleares para o diagnóstico das células germinativas iniciais e finais, respectivamente.

Nos peixes, as espermatogônias primárias (tipo A) são as maiores células da linhagem germinativa. Estão envolvidas completamente pelo citoplasma das células de Sertoli (Pudney, 1995) e apresentam “nuages” e “lamellae anulata” como características citoplasmáticas comuns (Pudney, 1995; Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999). As “nuages” são materiais citoplasmáticos densos e encontrados ao redor do envoltório nuclear ou em associação à mitocôndrias (Eddy, 1975; Clerot, 1976) ou à “lamellae anulata” (Kessel, 1983). Em *S. spilopleura*, as “nuages” ocorrem ao redor do envoltório nuclear ou associadas à grupos de mitocôndrias, porém não foram observadas junto à “lamellae anulata”. A associação das “nuages” com as “lamellae anulata” ocorre em *Sorubim lima* (Siluriformes: Pimelodidae) (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999) e *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes: Sciaenidae) (Gusmão et al., 2002). As “nuages” são também denominadas de “corpos germinativos densos”, “material granular”, “material ribonuclear” e “cimento intermitocondrial” (Pudney, 1995). Análises bioquímicas (Tourey et al., 1977) revelam que as “nuages” são constituídas por ribonucleoproteínas, RNAs de longa duração (RNAr e RNAm), proteínas, citocromos e lipídios. Trabalhos recentes comprovam que os RNAs de longa duração das “nuages” são fundamentais para diferenciação e

desenvolvimento das células germinativas e têm sua expressão regulada por hormônios gonadais (Kobayashi et al., 2000; Cardinali et al., 2004; Xu et al., 2005).

As espermatogônias primárias dão origem às espermatogônias secundárias (tipo B) que estão conectadas por pontes citoplasmáticas devido à citocinese incompleta. As espermatogônias secundárias sofrem sucessivas divisões mitóticas antes de originarem os espermátócitos I. Durante as divisões mitóticas, as espermatogônias de *S. spilopleura*, *S. lima* (Siluriformes: Pimelodidae) (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999) e *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) (Negrão et al., 2002) apresentam as pontes citoplasmáticas com reforço de membrana, no intuito de se estabilizarem e garantirem uma sincronização no desenvolvimento das células germinativas (Fawcett et al., 1959). Em algumas espécies, durante a mitose e/ou meiose a sincronização é parcial e as espermatogônias e os espermátócitos, particularmente os espermátócitos II, são encontrados em diferentes etapas da divisão do material nuclear (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999; Fishelson et al., 2006). Em *S. spilopleura*, a não-sincronização foi observada apenas em cistos de espermátócitos. Com a progressão das divisões mitóticas, as espermatogônias secundárias de *S. spilopleura* tornam-se menores, com poucas “nuages” e mitocôndrias mais densas e alongadas. Essas observações também ocorrem em outros teleósteos (Pudney, 1995; Guraya, 2001; Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999; Negrão et al., 2002; Gusmão et al., 2002; Lo Nostro et al., 2003b; Koulisch et al., 2003; Fishelson, 2003; Fishelson et al., 2006; Batlouni et al., 2006). As espermatogônias secundárias de *S. spilopleura* assim como de *S. lima* (Siluriformes: Pimelodidae) (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999), *P. squamosissimus* (Perciformes: Sciaenidae) (Gusmão et al., 2002) e *H. malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) (Negrão et al., 2002) possuem polaridade estrutural devido à concentração de organelas (vesículas, complexo de Golgi, centríolos e mitocôndrias) ao redor das pontes citoplasmáticas. Nessas espécies, um dos elementos dos centríolos pode ancorar-se na membrana plasmática e originar um cílio curto.

Na ausência de um marcador específico para espermatogônias primárias e secundárias dos teleósteos, Schulz e Miura (2002) sugerem o critério de espermatogônia dos mamíferos: do tipo A (de divisão lenta e menor incorporação de BrdU) e do tipo B (de ciclos mitóticos rápidos e maior incorporação de BrdU). No entanto, os dados da ultra-

estrutura, de nosso estudo e dos demais trabalhos supracitados, permitem identificar claramente um tipo do outro.

Na prófase, os espermatócitos I são identificados através da compactação da cromatina e da formação dos elementos do complexo sinaptonêmico (Pudney, 1995; Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999). Em *S. spilopleura*, os espermatócitos em zigóteno possuem apenas os elementos laterais do complexo sinaptonêmico, enquanto que os em paquíteno apresentam os elementos lateral e central do complexo sinaptonêmico. Durante a prófase meiótica de *S. spilopleura*, os centríolos exibem um comportamento semelhante ao que ocorre na mesma fase de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) (Quagio-Grassiotto & Lello, 1996): os centríolos se duplicam, migram para os pólos opostos e um de seus elementos ancora-se na membrana plasmática e dá origem a um cílio pequeno. Esse evento também é documentado em *S. lima* (Siluriformes: Pimelodidae) (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999).

Na espermiogênese dos peixes, as principais modificações citoplasmáticas e nucleares são: formação do flagelo, migração do complexo centriolar em relação ao núcleo, rotação nuclear e compactação da cromatina (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto et al., 2003). Essas observações permitem classificar os espermatozóides dos peixes em tipo I (flagelo perpendicular ao núcleo) ou tipo II (flagelo paralelo ao núcleo) (Mattei, 1991). A estrutura dos espermatozóides varia consideravelmente entre os teleósteos e pode ser utilizada em análises filogenéticas. A espermiogênese e a estrutura do espermatozóide de *S. spilopleura*, bem como suas inferências filogenéticas, estão descritas em Gusmão-Pompiani e colaboradores (manuscrito submetido).

Nos peixes, a liberação dos espermatozóides na luz do compartimento germinativo (espermição) ocorre através da ruptura dos cistos (Pudney, 1993; Grier, 1993). Os dados de *S. spilopleura* sugerem que a espermição envolve a formação de vesículas que se interconectam com a membrana plasmática e geram orifícios de diferentes tamanhos por onde saem os espermatozóides

Células de Sertoli

Durante a espermatogênese, as células germinativas passam por alterações que dependem do suporte estrutural e funcional das células de Sertoli (Pudney 1993; Schulz, 2003). Em *S. spilopleura*, as células de Sertoli são constantemente recrutadas para formação dos cistos, isto é, uma única célula de Sertoli participa de dois ou mais cistos de diferentes células germinativas. Esse princípio é a base do epitélio germinativo estratificado de *S. spilopleura*. Uma única célula de Sertoli emite projeções para formar, ao mesmo tempo, cistos apicais de células germinativas (em desenvolvimento avançado) e também cistos basais de espermatogônias (as figuras 3D, 4A e 13 ilustram claramente essa observação). Essa organização das células de Sertoli também ocorre em *Culaea inconstans* (Gasterosteiformes: Gasterosteidae) (ver Pudney, 1993) e *T. bifasciatum* (Perciformes: Labridae) (Koulish et al., 2002) e parece estar associada ao modo de reprodução contínua.

As micrografias eletrônicas sugerem que o epitélio germinativo de *S. spilopleura* é constituído por várias camadas e que nem todas as células de Sertoli tocam a lâmina basal. No entanto, secções seriadas de microscopia eletrônica seriam necessárias para confirmar essa observação. Por outro lado, através do epitélio descontínuo, constituído por apenas uma única camada de célula de Sertoli, é possível inferir que todas as células de Sertoli estão apoiadas diretamente na lâmina basal. Dessa forma, histologicamente, o epitélio germinativo de *S. spilopleura* pode ser classificado como pseudo-estratificado, isto é, constituído por uma única camada de células de Sertoli com núcleos em diferentes alturas e com capacidade de formar cistos mais apicais ou mais basais. No entanto, funcionalmente, o epitélio deve ser considerado como estratificado, sendo a maturação em estratos a responsável pela produção contínua de espermatozóides durante o ciclo reprodutivo.

Em *S. spilopleura*, células de Sertoli elétron-densas e elétron-lúcidas pertencem a um mesmo cisto de espermatogônia. Esse fato, também documentado em *T. bifasciatum* (Koulish et al., 2002), indica o reaproveitamento das células de Sertoli a cada ciclo espermatogênico. Apesar de não existir um significado funcional sobre a elétron-densidade, o estado denso é interpretado como um estágio inicial de diferenciação (Brusle, 1987), em que o aumento do conteúdo protéico é o responsável pela aparência densa dessas células (Watenberg et al., 1989 apud Koulish et al., 2002).

Durante a espermatogênese, o volume dos cistos aumenta e conseqüentemente o citoplasma das células de Sertoli alonga-se, favorecido pela lâmina basal pregueada e pelas interdigitações. A coesão entre as células de Sertoli de *S. spilopleura* é garantida pelo complexo juncional (junções de oclusão, aderência, gap e desmossomos), documentado em vários outros teleósteos (Pudney, 1993). A junção de oclusão é considerada como a evidência morfológica da barreira hemato-testicular e está descrita em *Aphanius dispar* (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae) (Abraham et al., 1980), *Salaria pavo* (Perciformes: Blenniidae) (Lahnsteiner & Patzner, 1990), *Cyprinus carpio* (Cypriniformes: Cyprinidae) (Parmentier et al., 1985), *O. niloticus* (Perciformes: Cichlidae) (Silva & Godinho, 1989), *P. fasciatum* (Siluriformes: Pimelodidae) (Batlouni et al., 2005) e outros teleósteos (Pudney, 1993). Diferentemente dos mamíferos, a barreira hemato-testicular dos peixes, em geral, forma-se durante os cistos de espermátides, ou seja, após a meiose dos espermátócitos (Silva & Godinho, 1989; Lahnsteiner & Patzner, 1990). Recentemente, as junções gap foram identificadas entre célula germinativa – célula de Sertoli e célula germinativa – célula germinativa de *P. fasciatum* (Siluriformes: Pimelodidae), sugerindo papel dessa junção na sincronização do desenvolvimento das células germinativas (Batlouni et al., 2005). O citoplasma das células de Sertoli de *S. spilopleura* possui vesículas revestidas por clatrina; vesículas de transcitose; prolongamentos citoplasmáticos para o interior dos cistos; lisossomos; fagossomos e vacúolos residuais. Essas características, também documentadas em outros teleósteos (ver Pudney, 1993), indicam funções de nutrição, suporte e fagocitose de espermatozóides residuais e/ou células germinativas apoptóticas. As células de Sertoli de *S. spilopleura*, como de *Esox lucius* (Esociformes: Esocidae) (Grier et al., 1989), *Myloleuiscus ternetzi* (Characiformes: Characidae) (Loir et al., 1995), *Mylossoma aureum* (Characiformes: Characidae) (Cruz-Höfling & Cruz-Landim, 1984) e outras (p. 630, The Sertoli cell - Pudney, 1993), apresentam inclusões de lipídios durante toda a espermatogênese. *S. spilopleura*, *M. ternetzi* e *M. aureum* pertencem à mesma subfamília (Serrasalminae), o que sugere que a lipofilia é uma característica comum nas células de Sertoli dos representantes dessa subfamília. No epitélio descontínuo de *S. spilopleura*, as células de Sertoli possuem grande quantidade de elementos vesiculares (aparentemente REL), muitas inclusões lipídicas, fagossomos, corpos residuais e projeções citoplasmáticas

em direção à luz do compartimento germinativo. Após tratamento hormonal para espermição, as células de Sertoli de *Tilapia rendalli* (Perciformes: Cichlidae) (Van Vuren & Soley, 1990) também compartilham as características supracitadas: REL, fagossomos, corpos residuais e projeções citoplasmáticas para luz do compartimento germinativo. Apesar da lipofilia, mitocôndrias com cristas tubulares e REL abundante serem diagnósticos de células esteroidogênicas (Guraya, 1976), nos peixes, em especial nas células de Sertoli, essas características, por si só, são insuficientes para revelar o potencial endócrino. A evidência esteroidogênica deve ser interpretada como uma somatória das observações morfológicas e fisiológicas.

Ciclo reprodutivo

O epitélio germinativo dos peixes tem sido utilizado para descrever ciclos reprodutivos anuais em *C. undecimalis* (Perciformes) (Grier & Taylor, 1998), *C. nebulosus* (Perciformes) (Brown-Peterson & Warren, 2001), *R. canadum* (Perciformes) (Brown-Peterson et al., 2002), *S. marmoratus* (Synbranchiformes) (Lo Nostro et al., 2003a), *P. martensi* (Perciformes) (Cinquetti & Dramis, 2003) e em *P. fasciatum* (Siluriformes) (Batlouni et al., 2006), com base na alternância entre o epitélio germinativo contínuo e descontínuo e nos estágios de desenvolvimento das células germinativas (Grier, 2002). Durante o ciclo reprodutivo de *S. spilopleura*, não foi possível diagnosticar classes reprodutivas, pois o testículo apresentou todos os tipos de células germinativas e os dois tipos de epitélio em toda sua amostragem. No entanto, dois grupos testiculares foram observados; um em que o IGS manteve-se constante; e outro com IGS elevado. Quando o IGS é estável, o testículo possui duas regiões: uma medular com predominância de epitélio germinativo contínuo; e uma região cortical, com epitélio contínuo e descontínuo com luz ampla, ramificada e repleta de espermatozoides. A região medular é considerada espermatogênica, enquanto que a cortical é espermatogênica, porém principalmente de armazenamento de espermatozoides. Com o processo de maturação, a região cortical torna-se mais desenvolvida, com predominância de epitélio descontínuo, luz larga e repleta de espermatozoides. Esse padrão testicular corresponde ao grupo de IGS elevado. O recrutamento de uma determinada região (espermatogênica ou armazenamento) deve

ocorrer em função das condições ambientais. Condições favoráveis resultam em regiões de armazenamento mais desenvolvidas e conseqüentemente IGS elevado, que indica, provavelmente, o período de maior frequência reprodutiva da espécie. A presença de espermatozóides e das duas regiões (espermatogênica e armazenamento) durante o ciclo reprodutivo caracterizam a reprodução contínua de *S. spilopleura*.

Dois tipos de ciclos reprodutivos são descritos em anfíbios (Van Oordt, 1960): contínuo, com produção constante de espermatogônias e espermatozóides; e descontínuo, com espermatozóides presentes em apenas uma determinada época do ano. Essa descrição também se estende aos peixes teleósteos e pode ser compreendida através da atividade mitótica das espermatogônias. Na reprodução contínua, as espermatogônias têm atividade mitótica constante e por isso o epitélio produz espermatozóides durante todo o ciclo reprodutivo. Na reprodução descontínua, as espermatogônias vão perdendo sua atividade mitótica e por essa razão os espermatozóides ocorrem apenas em um determinado período do ciclo. Marcadores de divisão mitótica, como ciclinas (Kang et al, 1997) ou PCNA (Chieffi et al, 2001), devem ser considerados na compreensão dos ciclos reprodutivos dos vertebrados. Em *S. spilopleura*, o PCNA indica intensa proliferação das espermatogônias durante o ciclo reprodutivo. Dessa forma, conclui-se que o epitélio germinativo estratificado de *S. spilopleura* é resultado da intensa proliferação espermatogonial associada à capacidade das células de Sertoli em formar mais de um tipo de cisto. Essas estratégias permitem a produção contínua de espermatozóides (espermatogênese contínua), o que sustenta o modelo de reprodução contínua.

PCNA e TUNEL

Os núcleos dos espermatócitos de *S. spilopleura*, assim como de *Podarcis s. sicula* (lagartixas) (Chieffi et al, 2001) e de mamíferos (Kang et al, 1997), possuem imunomarcacão para o antígeno de proliferação (PCNA). Essa expressão é atribuída ao envolvimento do PCNA em processos de síntese de DNA, que ocorrem durante o crossing-over (recombinação gênica) da prófase meiótica (Chieffi et al., 2001).

Nos mamíferos, as células de Sertoli cessam sua atividade mitótica durante a primeira onda espermatogênica de modo que, nos adultos, o número de células de Sertoli é

fixo e determina a produção espermática final das espécies (França & Russell, 1998). Nos peixes teleósteos, a proliferação das células de Sertoli também determina o número final de espermatozoides produzidos por cisto (Matta et al., 2000). Modelos de hipotireoidismo neonatal transitório em *O. niloticus* (Perciformes: Cichlidae) (Matta et al., 2002) aumentam o período de proliferação das células de Sertoli e conseqüentemente aumentam a produção espermática final. Matta e colaboradores (2002) também demonstram que nos peixes, a capacidade suporte das células de Sertoli é 10 vezes superior que dos mamíferos (ver também Vilela et al., 2003), e que os hormônios tireoideanos dos peixes, assim como dos mamíferos, são responsáveis pela diferenciação das células de Sertoli. A proliferação das células de Sertoli também tem sido documentada em teleósteos adultos como *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) (Billard, 1969); *P. latipinna* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) (Grier, 1993); *C. gariepinus* (Siluriformes: Clariidae) (Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2005); *T. bifasciatum* (Perciformes: Labridae) (Koulisch et al., 2002); *O. niloticus* (Perciformes: Cichlidae) (Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005); *S. marmoratus* (Synbranchiformes: Synbranchidae) (Lo Nostro et al., 2003a) e *Sparus aurata* (Perciformes: Sparidae) (Chaves-Pozo et al., 2005). Nas espécies estudadas, as células de Sertoli proliferam, em maior frequência, quando associadas à espermatogônias, embora também possam se dividir em cistos de espermatócitos (Billard, 1969; Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005) e de espermátides (Koulisch et al., 2002; Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005). Estudos morfométricos mostram que o número de células de Sertoli de *O. niloticus* (Perciformes: Cichlidae) (Vilela et al., 2003) aumenta gradualmente até os cistos de espermatócitos em zigóteno e depois se estabiliza nos cistos de células germinativas mais avançadas. Alguns trabalhos também sugerem que nos teleósteos adultos, as células de Sertoli têm origem a partir de precursores do mesotélio da cápsula testicular (Koulisch et al., 2002) ou de precursores mesenquimais do interstício (Pudney, 1993).

As células de Sertoli de *S. spilopleura* proliferam apenas no epitélio germinativo descontínuo. Sua divisão ocorre quando estão isoladas (não fazem parte de cistos) ou quando associadas à cistos de espermatogônias que não estão em divisão. Dessa forma, as células de Sertoli proliferam antes das espermatogônias, a fim de garantir um número adequado para acompanhar o crescimento dos cistos durante a espermatogênese. A divisão

das células de Sertoli tem fornecido subsídios para a compreensão das sucessivas gerações de células de Sertoli durante o ciclo reprodutivo (Koulish et al., 2002; Lo Nostro et al., 2003a), crescimento testicular a cada período reprodutivo (Vilela et al., 2003; Shulz et al., 2005) e para aumentar a produção espermática final das espécies (Matta et al., 2002).

A apoptose testicular, documentada em *S. spilopleura*, é uma ocorrência normal da espermatogênese e permite a manutenção do número adequado de células germinativas para cada célula de Sertoli do cisto. Em *S. spilopleura*, as apoptoses ocorrem principalmente em cistos de espermatócitos e espermátides. Células germinativas apoptóticas são fagocitadas pelas células de Sertoli. Neste trabalho, não foram encontradas apoptoses em células de Sertoli. No entanto, no epitélio germinativo descontínuo, algumas células de Sertoli apresentam sinais de degeneração (ver Fig. 6J). Em *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii: Torpedinidae) (Prisco et al., 2003), a degeneração das células de Sertoli é associada à espermição dos cistos. As degenerações das células de Sertoli sugerem que esse tipo celular deve proliferar para substituir às células que morreram. Estudos recentes (Andreu-Vieyra et al., 2005) revelam que o GnRH induz apoptose nos testículos maduros de *Carassius auratus* (Cypriniformes: Cyprinidae) e desempenha papel autócrino e parácrino na regulação do desenvolvimento testicular dessa espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP) pelas facilidades de uso e acesso; à Sra. Maria Helena Moreno pelo auxílio na microscopia eletrônica, em especial nas micrografias eletrônicas e ao Sr. Antônio Vicente Salvador pelo auxílio histológico. Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Literatura Citada

- Abraham M, Rahamin E, Tibika H, Golenser E. 1980. The blood-testis barrier in *Aphanius dispar* (Teleost). Cell Tissue Res 211:207-214.
- Andreu-Vieyra CV, Buret AG, Habibi HR. 2005. Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). Endocrinology 146:1588-1596.

- Batlouni SR, Carreño FR, Romagosa E, Borella MI. 2005. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatus* (Pisces, Siluriformes). *J Mol Hist* 36:97-110.
- Batlouni SR, Romagosa E, Borella MI. 2006. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatus* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addresses to aquaculture. *Anim Reprod Sci* doi:10.1016/j.anireprosci.2005.11.012.
- Billard R. 1969. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata* I. Estimation du nombre de generations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann Biol Bioch Biophys* 9:251-271.
- Brown-Peterson NJ, Grier HJ, Overstreet RM. 2002. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *J Fish Biol* 60:178-202.
- Brown-Peterson NJ, Warren JW. 2001. The reproductive biology of spotted sea trout, *Cynoscion nebulosus*, along the Mississippi Gulf Coast. *Gulf Mex Sci* 2001:61-73.
- Brusle S. 1987. Sex-inversion of the hermaphroditic, protogynous teleost *Coris julis* L. (Labridae). *J Fish Biol* 30:65-616.
- Callard GV, Callard IP. 1999. Spermatogenesis, in nonmammals. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 4. San Diego, CA: Academic Press. p 563-570.
- Cardinali M, Giachini G, Candiani S, Pestarino M, Yoshizaki G, Carnevali O. 2004. Hormonal regulation of vasa-like RNA expression in the ovary of the marine teleost *Sparus aurata*. *Biol Reprod* 70:737-743.
- Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J, Ayala AG. 2005. An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biol Reprod* 72:593-601.
- Chieffi P, Nasti M, Fulgione D, Franco R. 2001. Expression of PCNA in the testis of the lizard, *Podarcis s. sicula*: an endogenous molecular marker of mitotic germinal epithelium proliferation. *Zygote* 9:317-322.
- Cinquetti R, Dramis L. 2003. Histological, histochemical, enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* between annual breeding seasons. *J Fish Biol* 63:1402-1428.
- Clerot JC. 1976. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens cyprinidés. I. Etude ultrastructurale. *J Ultrastruct Res* 54:461-475.
- Cruz-Höfling MA, Cruz-Landim C. 1984. Ultrastructural and histochemical studies on the Leydig and Sertoli cell homologues in the testis of *Tripurtheus elongatus* (Sardinhão) and *Mylossoma aureum* (Pacu). *Cytobios* 41:161-174.
- Eddy EM. 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ line. *Int Rev Cytol* 43:229-280.
- Fawcett DW. 1961. Intercellular bridges. *Exp Cell Res Suppl* 8:174-187.
- Fishelson L. 2003. Comparison of testes structure, spermatogenesis, and spermatocytogenesis in young, aging, and hybrid cichlid fish (Cichlidae, Teleostei). *J Morphol* 256:285-300.
- Fishelson L, Delarea Y, Gon O. 2006. Testis structure, spermatogenesis, spermatocytogenesis, and sperm structure in cardinal fish (Apogonidae, Perciformes). *Anat Embryol* 211:31-46.

- França LR, Russell LD. 1998. The testis of domestic animals. In: Martínez-García F, Regadera J, editors. Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications 1998:198-219.
- Fujihara CY. 1997. Dinâmica populacional de *Serrasalmus spilopleura*, Kner, 1860 no reservatório de Jurumirim (rio Paranapanema, SP): aspectos do crescimento, estrutura populacional, reprodução e nutrição. 91p. Dissertação (mestrado), Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.
- Grier HJ, Linton JR, Leatherland JF, de Vlaming VL. 1980. Structural evidence for two difference testicular types in teleost fishes. *Amer J Anat* 159:331-345.
- Grier HJ, van den Hurk R, Billard R. 1989. Cytological identification of cell types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. *Cell Tissue Res* 257:491-496.
- Grier HJ, Taylor RG. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. *J Fish Biol* 53:521-542.
- Grier H, Lo Nostro F. 2000. The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In: Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO, editors. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norway: University of Bergen. p 233-236.
- Grier HJ. 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer Zool* 21:345-357.
- Grier HJ. 1992. Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. *J Exp Zool* 261:151-160.
- Grier H.J. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russell LD, Griswold MD, editors. The Sertoli cell. Clearwater, FL: Cache River Press. p 704-739.
- Grier H. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J Morphol* 243:265-281.
- Grier HJ. 2002. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Creswell RL, editor. Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, November 2000. Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium. p 537-552.
- Guraya SS. 1976. Recent advances in the morphology, histochemistry and biochemistry of steroid-synthesizing cellular sites in the testes of nonmammalian vertebrates. In *Rev Cytol* 47:99-136.
- Guraya SS. 2001. Comparative Cellular and Molecular Biology of Testis in Vertebrates. Trends in Endocrine, Paracrine and Autocrine Regulation of Structure and Functions. Science Publishers, Inc.
- Gusmão P, Foresti F, Quagio-Grassiotto I. 2002. The ultrastructure of the pre-meiotic and meiotic stages of spermatogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). *J Submicrosc Cytol Pathol* 34(2):159-65.
- Kang MJ, Kim MK, Terhune A, Park JK, Kim YH, Koh GY. 1997. Cytoplasmic localization of cyclin D3 in seminiferous tubules during testicular development. *Exp Cell Res* 234:27-36.
- Kessel RG. 1983. The structure and function of annulate lamellae, porous cytoplasmic and intranuclear membrane. *Int Rev Cytol* 82:181-303.

- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. 2000. Differential expression of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech Dev* 99:139-142.
- Koulisch S, Kramer CR, Grier HJ. 2002. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J Morphol* 254:292-311.
- Lahnsteiner F, Patzner RA. 1990. Potential steroid producing cells in the testis of *Solaria* (= *Blennius*) *pavo* (Teleostei, Blenniidae): Leydig cells, Sertoli cells and testicular cells clusters. *Zool Anz* 225:87-100.
- Lahnsteiner F, Patzner RA, Weismann T. 1994a. Testicular main ducts in some cyprinid fishes. I. Morphology, fine structure and histochemistry. *J Fish Biol* 44:937-951.
- Lahnsteiner F, Patzner RA, Weismann T. 1994b. The testicular main ducts and the spermatic ducts in some cyprinid fishes. II. Composition of the seminal fluid. *J Fish Biol* 44:459-467.
- Lamas IR, Godinho AL. 1996. Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a neotropical fish with an usual pattern of sexual maturity. *Environ Biol Fishes* 45:161-168.
- Le Gac F, Loir M. 1999. Male reproductive system, fish. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 3. San Diego, CA: Academic Press. p 20-30.
- Leão ELM. 1996. Reproductive biology of piranhas (Teleostei, Characiformes). In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ, editors. *Physiology and Biochemistry of fishes of the Amazon*. p 31-41.
- Lo Nostro F, Grier H, Andreone L, Guerrero GA. 2003a. Involvement of the gonadal germinal epithelium during sex reversal and seasonal testicular cycling in the protogynous swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). *J Morphol* 257:107-126.
- Lo Nostro FL, Grier H, Meijide FJ, Guerrero GA. 2003b. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. *Tissue Cell* 35:121-132.
- Loir M, Sourdain P, Mendis-Handagama SMLC, Jégou B. 1995. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc Res Tech* 32:533-552.
- Matta SLP, Vilela DAR, Godinho HP, França LR. 2002. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology* 143:970-978.
- Mattei X. 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Can J Zool* 69:3038-3055.
- Meijide FJ, Lo Nostro FL, Guerrero GA. 2005. Gonadal development and sex differentiation in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): a light- and electron-microscopic study. *J Morphol* 264:191-210.
- Miura C, Miura T, Kudo N, Yamashita M, Yamauchi K. 1999. cDNA cloning of a stage-specific gene expressed during HCG-induced spermatogenesis in Japanese eel. *Develop Growth Differ* 41: 463-471.
- Miura C, Miura T, Yamashita M. 2002. PCNA protein expression during spermatogenesis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Zool Science* 19:87-91.
- Miura T, Miura CI. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol Biochem* 28:181-186.

- Negrão JNC, Carvalho ED, Foresti F, Quagio-Grassiotto I. 2002. Spermatogonia and spermatocyte ultrastructure in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes: Erythrinidae). *J Zool Lond* 257:287-293.
- Parenti LR, Grier, HJ. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr Comp Biol* 44:333-348.
- Parmentier HK, van den Boogaart JGM, Timmermans LPM. 1985. Physiological compartmentation in gonadal tissue of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Cell Tissue Res* 242:75-81.
- Prisco M, Liguoro A, Comitato R, Cardone A, D'Onghia B, Ricchiari L, Angelini F, Andreuccetti P. 2003. Apoptosis during spermatogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol Reprod Dev* 64:341-348.
- Pudney J. 1993. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: Russell LD, Griswold MD, editors. *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press. p 611-657.
- Pudney J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech* 32:459-497.
- Quagio-Grassiotto I, Lello E. 1996. Centriole behavior during meiosis of male germ cells of *Dermatobia hominis* (Diptera, Cuterebridae). *Cytobios* 85:73-80.
- Quagio-Grassiotto I, Carvalho ED. 1999. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. *Tissue Cell* 31(6):561-567.
- Quagio-Grassiotto I, Carvalho ED. 2000. Ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermiogenesis. *J Submicrosc Cytol Pathol* 32(4):629-633.
- Quagio-Grassiotto I, Antoneli FN, Oliveira C. 2003. Spermiogenesis and sperm ultrastructure in *Cichla intermedia* with some considerations about Labroidei spermatozoa (Teleostei, Perciformes, Cichlidae). *Tissue Cell* 35:441-446.
- Quintero-Hunter I, Grier H, Muscato M. 1991. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotech Histochem* 66:169-172.
- Schleser DM. 1997. Piranhas: everything about origins, care, feeding, diseases, breeding, and behavior. Barron's Educational Series, Inc. New York 88 pp.
- Schulz RW, Miura T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem* 26:43-56.
- Schulz RW, van Dijk W, Bogerd J. 2003. Sertoli cell proliferation and FSH signaling in african catfish, *Clarias gariepinus*. *Fish Physiol Biochem* 28:223-224.
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR, Godinho HP. 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis – evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod* 73:891-898.
- Schulz RW. 2003. Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. *ARBS Annu Rev Biomed Sci* 5:57-68.
- Silva S, Godinho HP. 1989. Haemato-testicular barrier in *Oreochromis niloticus* (Teleost). *Rev Bras Cien Morfol* 6:9-13.
- Soares MJ. 1998. Detecção de lipídios. In: Souza W, editor. *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicada à Ciências Biológicas*. Sociedade Brasileira de Microscopia p 61-62.

- Teles MEO, Godinho HP. 1997. Ciclo reprodutivo da pirambeba *Serrasalmus brandtii* (Teleostei, Characidae) na Represa de Três Marias, Rio São Francisco. *Rev Brasil Biol* 57:177-184.
- Thacker C, Grier, H. 2005. Unusual gonad structure in the paedomorphic teleost *Schindleria praematura* (Teleostei: Gobioidae): a comparison with other gobioid fishes. *J Fish Biol* 66:378-391.
- Toury R, Clérot JC, André J. 1977. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons Téléostéen Cyprinidés. IV. Analyse biochimique des constituants du "ciment" intermitochondrial isolé. *Biol Cell* 30:225-232.
- Van Oordt PGWJ. 1960. The influence of the internal and external factors in the regulation of the spermatogenic cycle in amphibian. *Zool Soc London Symp* 2:29-52.
- Van Vuren JHJ, Soley JT. 1990. Some ultrastructural observations of Leydig and Sertoli cells in the testis of *Tilapia rendalli* following induced testicular recrudescence. *J Morphol* 206:57-63.
- Vilela DAR, Silva SGB, Peixoto MTD, Godinho HP, França LR. 2003. Spermatogenesis in teleost: insights from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiol Biochem* 28:187-190.
- Walter I, Tschulenk W, Schabuss M, Miller I, Grillitsch B. 2005. Structure of the seminal pathway in the european chub, *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae); Teleostei. *J Morphol* 263:375-391.
- Wartenberg H, Rodemer-Lenz E, Viebahn C. 1989. The dual Sertoli cell system and its role in testicular development and in early germ cell differentiation (prespermatogenesis). In: Holstein AF, Voigt KD, Graesslin G, editors. *Biologie und Klinik der Reproduktion*. Berlin: Diesbach Verlag. p 44-57.
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen O, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B. 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp Biochem Physiol A* 137:447-477.
- Xu H, Gui J, Hong Y. 2005. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Developmental Dynamics* 233:872-882.
- Yazawa T, Yamamoto T, Nakayama Y, Hamada S, Abé S-I. 2000. Conversion from mitosis to meiosis: morphology and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Dmcl during newt spermatogenesis. *Develop Growth Differ* 42:603-611.

Legenda das Figuras

Figura 1. Estrutura testicular de *S. spilopleura*. **A-C:** Anatomia do testículo; **D:** Hematoxilina/Eosina; **E-I:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow; **J:** Azul de Toluidina/Bórax. **A,B:** ventral (V) e dorsal (D). **A-C:** Os testículos são pares e estão presos à cavidade do corpo por um mesórquio rico em gordura perigonadal (pgf). O ducto espermático (sd) é único e resulta da fusão dorsal do ducto testicular principal (md) de cada testículo. O ducto espermático corresponde a um curto segmento que se exterioriza, caudalmente, através da papila urogenital (up). A região delimitada em C corresponde à secção histológica D, na qual os túbulos anastomosados (at) são observados. A cabeça de seta indica que a confluência do compartimento germinativo (na região dorsal e caudal) forma o ducto testicular principal (md). **E-H:** E-H são as secções transversais das regiões definidas em C. O testículo afila-se em suas extremidades (E e H) e é achatado ventro-lateralmente (v). O mesórquio (m) é dorsal (d) e constituído principalmente de vasos sangüíneos (bv) e gordura perigonadal (pgf). O testículo possui duas regiões nítidas: uma cortical com túbulos anastomosados (at) mais ramificados e luz repleta de espermatozóides; e uma região medular com poucas ramificações e luz menos nítida. Barra = 300µm. **I:** O compartimento intersticial (ic) foi delimitado para compreender a organização do compartimento germinativo. O compartimento germinativo forma uma rede altamente ramificada de túbulos e alças (asteriscos) que se interconectam desde a periferia ventro-lateral até toda extensão do testículo (F). Barra = 200µm. **J:** Os testículos são revestidos externamente por pela túnica albugínea (tc), formada por mesotélio e tecido conjuntivo subjacente. Internamente, o testículo é dividido em: compartimento germinativo (gc) que é revestido pelo epitélio germinativo (ge); e em compartimento intersticial (ic), que é uma extensão do tecido conjuntivo da cápsula testicular (tc). Barra = 100µm.

Figura 1

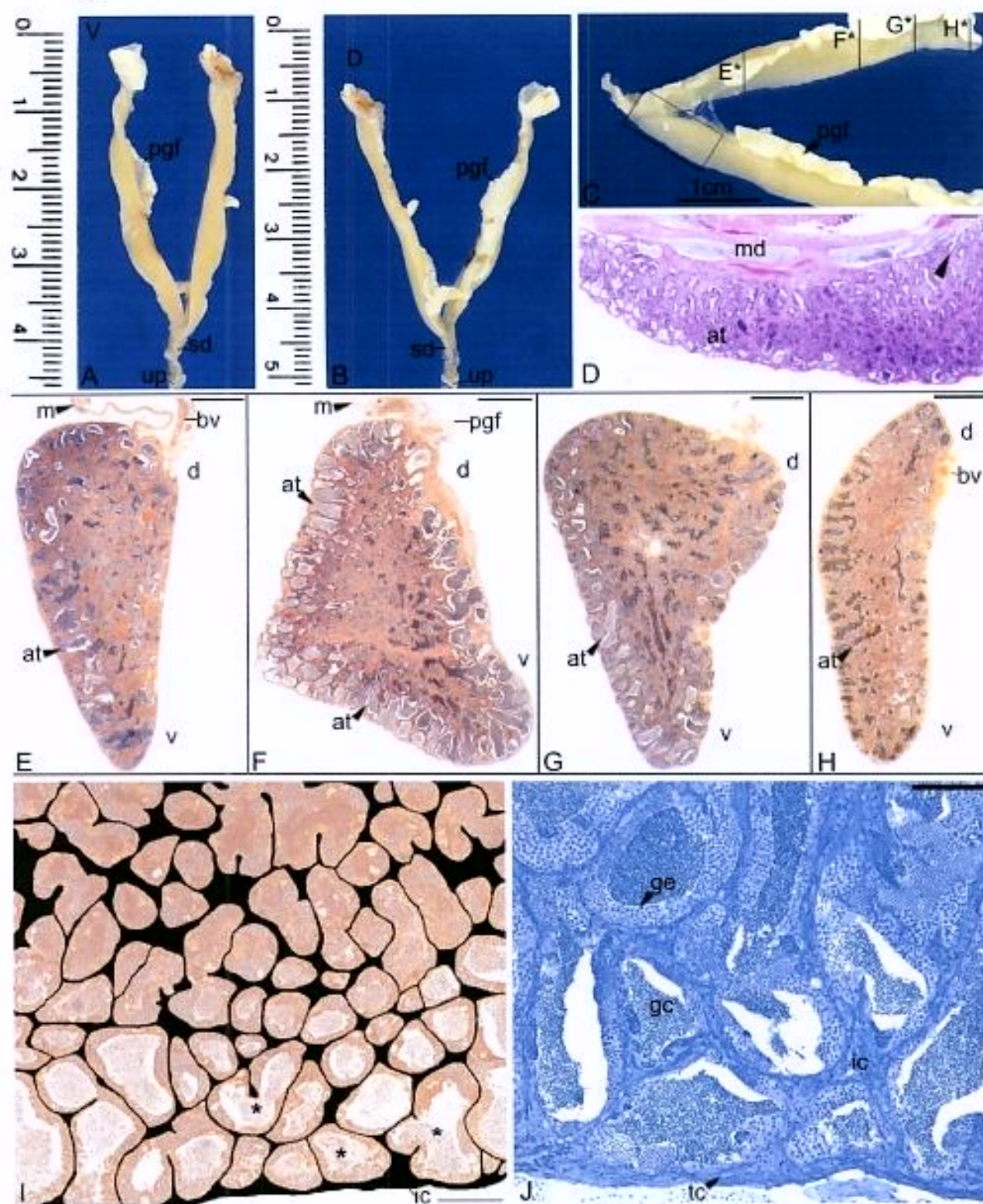


Figura 2. Proliferação espermatogonial de *S. spilopleura*. **A,B,D-M:**MET; **C:**ML. **A,B:** O epitélio germinativo é contínuo e formado por cistos de espermatogônias. A proximidade do epitélio gera constrições na luz do compartimento germinativo (dl, luz descontínua). As cabeças de setas (em A e B) indicam que as projeções citoplasmáticas das células de Sertoli (se) impedem a obliteração total da luz do compartimento germinativo. A. Barra = 2,5µm. B. Barra = 2,8µm. **C:** Epitélio germinativo contínuo (cge). Barra = 10µm. **D:** Notar que as células de Sertoli (se) apoiam-se sobre uma lâmina basal (bl) de muitas invaginações. Barra = 0,97µm. **E:** Espermatogônia primária de *S. spilopleura*. A espermatogônia primária é completamente envolvida pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (se). Asterisco indica elementos vesiculares no citoplasma da espermatogônia primária. Barra = 2,3µm. **F,G,H:** As regiões delimitadas em F correspondem às micrografias G e H, que mostram, respectivamente, parte do citoplasma e o envoltório nuclear dotado de complexos de poros (cabeças de setas) de uma espermatogônia primária. Observar que as células de Sertoli estão conectadas através de complexo juncional (jc) e de interdigitações (i). F. Barra = 1,5µm. G. Barra = 0,97µm. H. Barra = 1,4µm. **I:** Divisão dos cromossomos nas espermatogônias. Barra = 1,7µm. **J:** A cabeça de seta indica mitocôndrias (m) densas e alongadas que se fusionam durante a divisão mitótica das espermatogônias. Barra = 0,79µm. **K:** As pontes citoplasmáticas (b) exibem reforço de membrana (asterisco) durante a divisão das espermatogônias. Barra = 0,24µm. **L:** Espermatogônias secundárias de *S. spilopleura*. A região demarcada (M*) indica concentração de determinadas organelas ao redor das pontes citoplasmáticas. Barra = 2,29µm. **M:** Região próxima da ponte citoplasmática (b). Asterisco mostra passagem de vesículas no interior da ponte citoplasmática e a cabeça de seta indica que um dos elementos dos centríolos (c) ancora-se na membrana plasmática e pode originar um cílio curto. Barra = 0,48µm. g, complexo de Golgi; rb, corpo residual; cr, cromossomos; cf, fibras de colágeno; lp, inclusões de lipídio; i, interdigitações; nc, “nuages”; n, núcleo; nu, nucléolo; rer, retículo endoplasmático rugoso; v, vesículas membranosas.

Figura 2

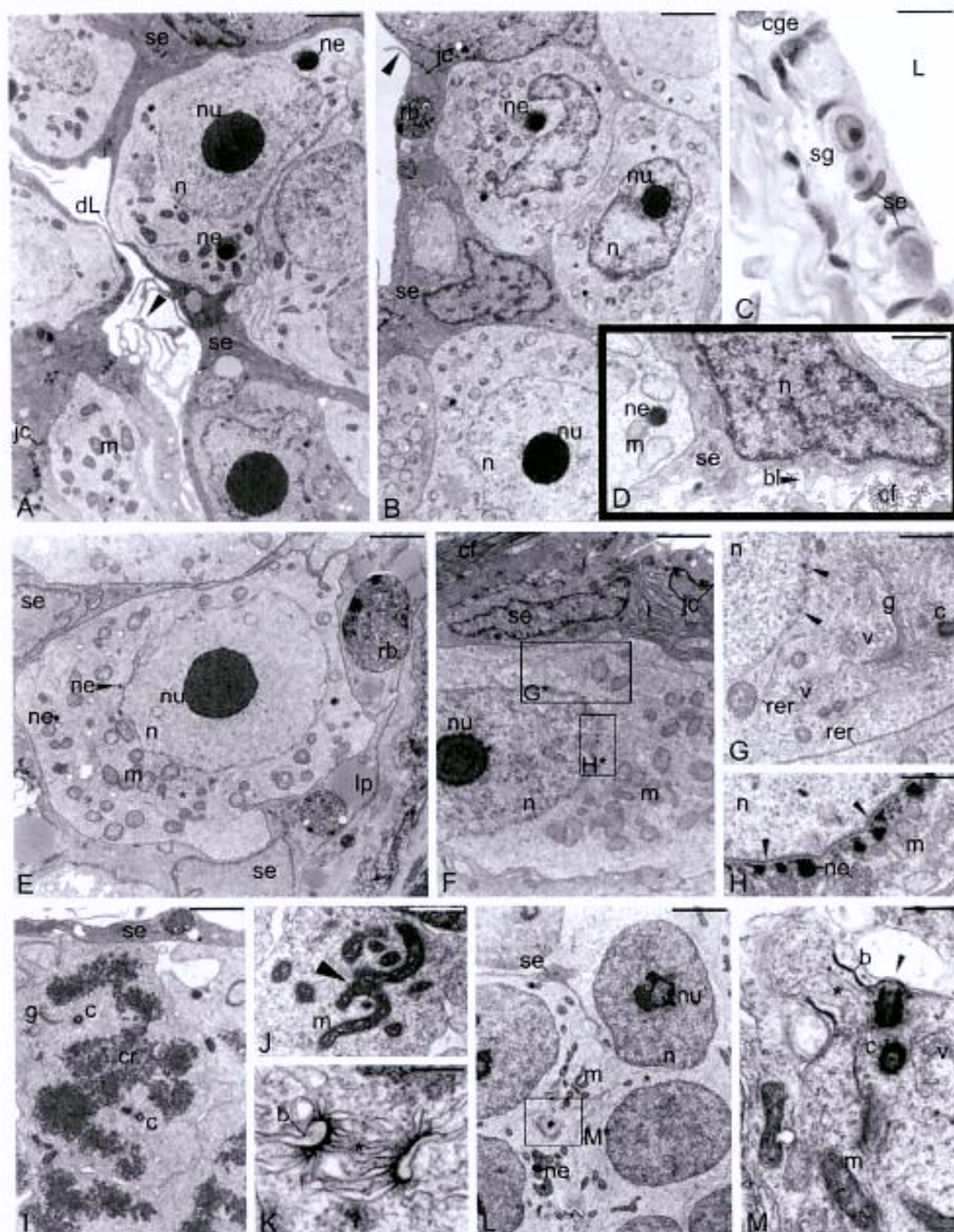


Figura 3. Meiose dos espermatócitos de *S. spilopleura*. A,B:MEV; C:ML; D-M:MET. A,B: Com a meiose, os cistos aumentam de volume e projetam-se na luz (L) do compartimento germinativo. Em A,B,C, a cabeça de seta indica a projeção dos cistos. A. Barra = 15,4µm. B. Barra = 13,3µm. C: Epitélio germinativo contínuo (cge) formado por cistos de diferentes células germinativas. Barra = 10µm. D: Epitélio germinativo contínuo (cge). O asterisco mostra que uma célula de Sertoli (sc) faz parte de mais de um tipo de cisto. Barra = 6,9µm. E: Espermatócitos em zigóteno (zsc). A cabeça de seta indica a formação dos elementos laterais (lc) do complexo sinaptonêmico. Determinadas organelas (asterisco) concentram-se ao redor da ponte citoplasmática (b). Barra = 1,6µm. F: Citoplasma de um espermatócito em zigóteno. A cabeça de seta dupla mostra que um dos elementos dos centríolos (c) ancora-se na membrana plasmática e pode originar um cílio curto. Barra = 0,47µm. G: Divisão assincrônica, com células em diferentes fases da meiose. A evidência morfológica do crossing-over (quiasma) é indicada pela cabeça de seta. Cromossomos (cr) em metáfase também são encontrados. Barra = 2,9µm. H: Espermatócitos em paquíteno (psc). O complexo sinaptonêmico (elemento lateral e central) é indicado pela cabeça de seta. Barra = 2,1µm. I: Os cromossomos tornam-se mais compactados (cabeça de seta) e o citoplasma (asterisco) apresenta poucas mitocôndrias (m) e “nuages” (ne). Barra = 2,1µm. J: Notar espermátides iniciais em relação à espermatócitos em paquíteno. O complexo sinaptonêmico (elemento lateral e central) é indicado pela cabeça de seta. Barra = 2,3µm. K-M: Durante a prófase meiótica, os centríolos (c) duplicam-se (cabeças de setas) e um dos elementos de cada par (cabeça de seta) pode ancorar-se na membrana plasmática e originar um cílio curto. K. Barra = 0,4µm. L. Barra = 0,4µm. M. Barra = 0,2µm. ic, compartimento intersticial; g, complexo de Golgi; cr, cromossomos; st, espermátides; sc, espermatócitos; sg, espermatogônia; sz, espermatozóides; bl, lâmina basal; my, mióide; m, mitocôndrias; ne, “nuages”; n, núcleo; v, vesículas membranosas.

Figura 3

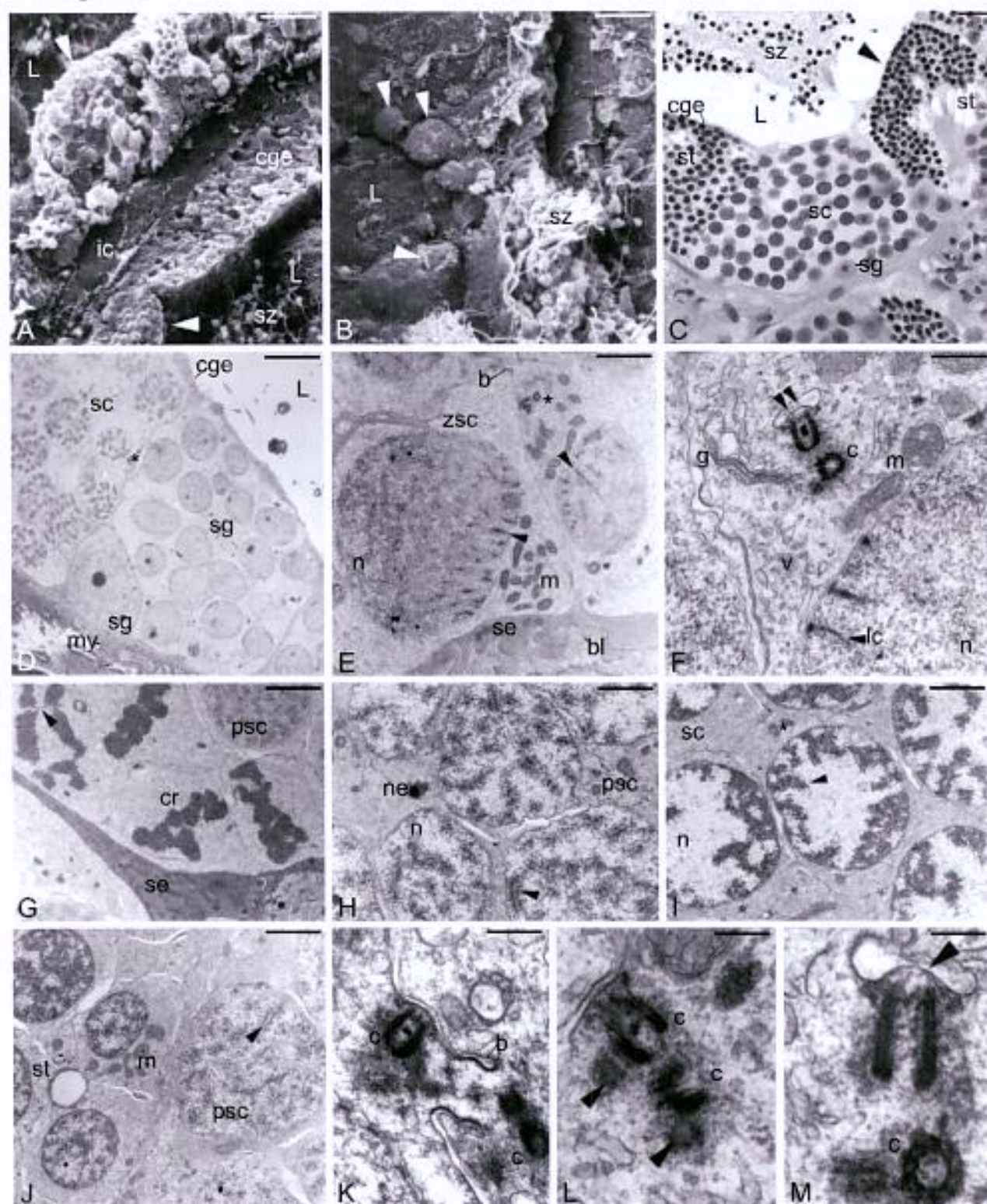


Figura 4. Espermiogênese e espermição de *S. spilopleura*. A-G,I,K,L,N:MET; H,J,M:MEV. A: Epitélio germinativo contínuo (cge) com cistos basais de espermatogônias (sg) e cistos apicais (asterisco) de células germinativas em estágio mais avançado. As espermátides (st) são encontradas em diferentes fases da espermiogênese (cabeças de setas). A. Barra = 6,9µm. B-F: Algumas das principais etapas da espermiogênese. O complexo centriolar (cabeça de seta) é formado pelo centriolo proximal (p) e pelo distal (d). O centriolo distal (d) origina o flagelo (f). Etapas da compactação da cromatina estão indicadas pelos asteriscos. Fossa nuclear curta (seta dupla), canal citoplasmático (seta) e vesículas (v) são observados nas espermátides em espermiogênese. B. Barra = 0,9µm. C. Barra = 0,9µm. D. Barra = 1,4µm. E. Barra = 1,4µm. F. Barra = 1,08µm. G: Espermição: abertura (asterisco) dos cistos para liberar os espermatozóides (sz) na luz (L) do compartimento germinativo. Barra = 5,9µm. H: Perspectiva da espermição na microscopia de varredura: notar pequenas aberturas (aspecto rendilhado na superfície dos cistos) (cabeça de seta) e uma abertura maior (asterisco) por onde saem os espermatozóides (sz). Barra = 4,1µm. I: Provavelmente, as vesículas (cabeça de seta) no citoplasma das células de Sertoli (se) fusionam-se com a membrana plasmática e geram aberturas de diferentes tamanhos (asterisco) por onde saem os espermatozóides (sz). Barra = 1,9µm. J: A fusão das vesículas gera um aspecto rendilhado (cabeça de seta) na superfície dos cistos; aberturas maiores (asterisco) também são observadas. Barra = 3,0µm. K: Epitélio germinativo descontínuo (dge): a espermição e a não renovação imediata das células germinativas geram descontinuidades no epitélio. O epitélio descontínuo é formado por trechos de células de Sertoli (se) entremeados por cistos dispersos de espermatogônias (sg). Barra = 5,1µm. L: A estratificação impede a descontinuidade no epitélio germinativo. Após a espermição, o epitélio não fica descontínuo por causa do estrato basal de espermatogônias (sg). Barra = 5,8µm. M,N: O espermatozóide: formado por cabeça (h), peça intermediária (mp) e flagelo (f). Em M a cabeça de seta indica a fusão das vesículas (v) com a membrana da peça intermediária. Em N, o padrão da compactação da cromatina (asterisco), a fossa nuclear curta (seta), o canal citoplasmático (cabeça de seta dupla) e as projeções laterais de membrana (cabeça de seta) são observados no espermatozóide. N. Barra = 1,5µm. M. Barra = 0,9µm. le, célula de Leydig; c, centriolos; ic, compartimento intersticial; g, complexo de Golgi; jc, complexo juncional; rb, corpos residuais; lp, inclusões de lipídio; m, mitocôndrias; ne, “nuages”; n, núcleo; bv, vaso sanguíneo.

Figura 5. Células de Sertoli de *S. spilopleura*. **A-G,I-L:**MET; **H:** Método do Ósmio Imidazol. **A:** Em uma secção transversal é possível contar pelo menos cinco células de Sertoli (se1,se2,se3,se4,se5) envolvendo uma única espermatogônia (sg). Células de Sertoli densas (se2,se3,se4,se5) e clérion-lúcidas (se1*) fazem parte de um mesmo cisto. As células de Sertoli (se) estão conectadas por complexos juncionais (jc). Uma única célula de Sertoli pode pertencer a mais de um tipo de cisto como ocorre em A e B. Barra = 1,7µm. **B:** As células de Sertoli emitem prolongamentos para o interior dos cistos (setas). A célula de Sertoli do cisto em divisão celular (cd) também faz parte do cisto de espermatócitos em zigóteno (zsc) (cabeças de seta em A e B indicam a formação dos elementos laterais do complexo sinaptonêmico). Barra = 2,5µm. **C:** Complexo juncional: junção de oclusão (oj), adesão (aj) e desmossomo (d). Notar vesícula revestida por clatrina (cabeça de seta) e vesículas (v). Barra = 0,5µm. **D:** Filamentos intermediários (if) e vários desmossomos (d). Barra = 0,7µm. **E:** Notar vesículas de transcitose (cabeças de seta). Barra = 0,4µm. **F,G:** Citoplasma das células de Sertoli. Notar prolongamentos das células de Sertoli (cabeças de seta) para dentro dos cistos ou para a luz (L) do compartimento germinativo. Observar em G várias vesículas (v) ao redor das inclusões de lipídios (lp). F. Barra = 0,8µm. G. Barra = 0,8µm. **H:** Inclusões de lipídios (lp) ficam escuras pelo Método do Ósmio-Imidazol. Barra = 1,3µm. **I:** Fagossomos (fg), corpos residuais (rb) são evidências morfológicas da fagocitose pelas células de Sertoli. As células de Sertoli também fagocitam células germinativas em apoptose (cabeça de seta). Barra = 2,1µm. **J-L:** Células de Sertoli do epitélio germinativo descontínuo (dge). Projeções (cabeças de seta) para luz (L), fagossomos (fg), retículo endoplasmático liso (ser), mitocôndrias (m) arredondadas ou alongadas são observadas nas células de Sertoli do epitélio germinativo descontínuo. Algumas células de Sertoli (se*) do epitélio descontínuo apresentam-se densas, com citoplasma vacuolizado (v) e com figuras de mielina (asterisco). J. Barra = 2,5µm. K. Barra = 1,02µm. L. Barra = 1,5µm. le, célula de Leydig; gc, célula germinativa; my, célula mióide; c, centríolos; ic, compartimento intersticial; g, complexo de Golgi; cr, cromossomo; cf, fibras de colágeno; bl, lâmina basal; m, mitocôndrias; nc, “nuages”; rer, retículo endoplasmático rugoso.

Figura 5

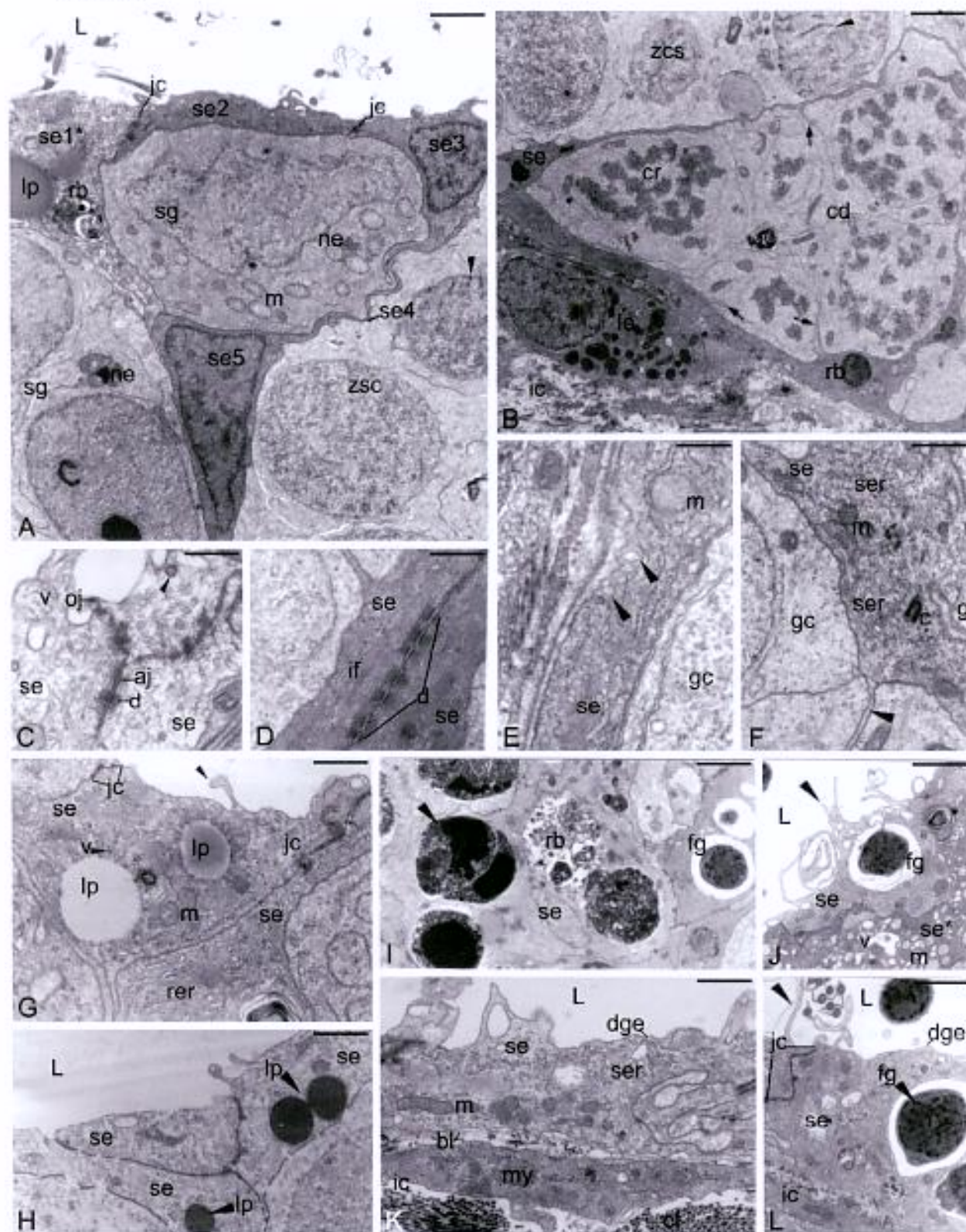


Figura 6. Cinética do epitélio germinativo de *S. spilopleura*. **A-H:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **A:** Inicialmente, o epitélio germinativo é contínuo (cge) e formado por um estrato basal de espermatogônias (sg) e um estrato apical de cistos em desenvolvimento mais avançado. O compartimento germinativo é separado do intersticial através de uma membrana basal (bm). Células de Leydig (le) são observadas no compartimento intersticial (ic). **B:** As espermatogônias basais comprometem-se com a espermatogênese e originam os espermatócitos (sc). O epitélio cresce em altura e reduz a luz (L) do compartimento germinativo. Células germinativas em divisão (d) são observadas (m, metáfase; a, anáfase). Notar as células mióides (my) ao redor dos túbulos. As células mióides são facilmente identificadas por essa coloração. **C,D:** Os cistos apicais espermiam (cabeça de seta) e o epitélio germinativo é contínuo (cge) e formado por uma monocamada de cistos de espermatócitos (sc). Os espermatozoides (sz) são liberados na luz (L) do compartimento germinativo. Algumas espermatogônias (sg) encontram-se por baixo dos cistos de espermatócitos (sc), porém não chegam a formar um estrato basal. Notar algumas vacuolizações PAS positivas (asterisco) no citoplasma das células de Sertoli (se). **E:** Os espermatócitos (sc) dão origem às espermátides (st), que se tornam predominantes no epitélio germinativo. As espermatogônias (sg) proliferam e formam um estrato basal em alguns trechos do epitélio germinativo. Notar espermatogônia escura. **F-H:** Nos trechos com estrato basal, a espermição (cabeça de seta) não resulta em descontinuidade, mas sim em um epitélio contínuo (cge) formado por espermatogônias (sg). Na ausência de estratos basais, a espermição gera um epitélio descontinuo (dgc). Cabeças de seta em H mostram as duas situações; a cabeça de seta à direita indica que a espermição não resultará em epitélio descontinuo. A cabeça de seta à esquerda mostra que a espermição gera descontinuidade do epitélio germinativo. A-H. Barra = 10µm.

Figura 6

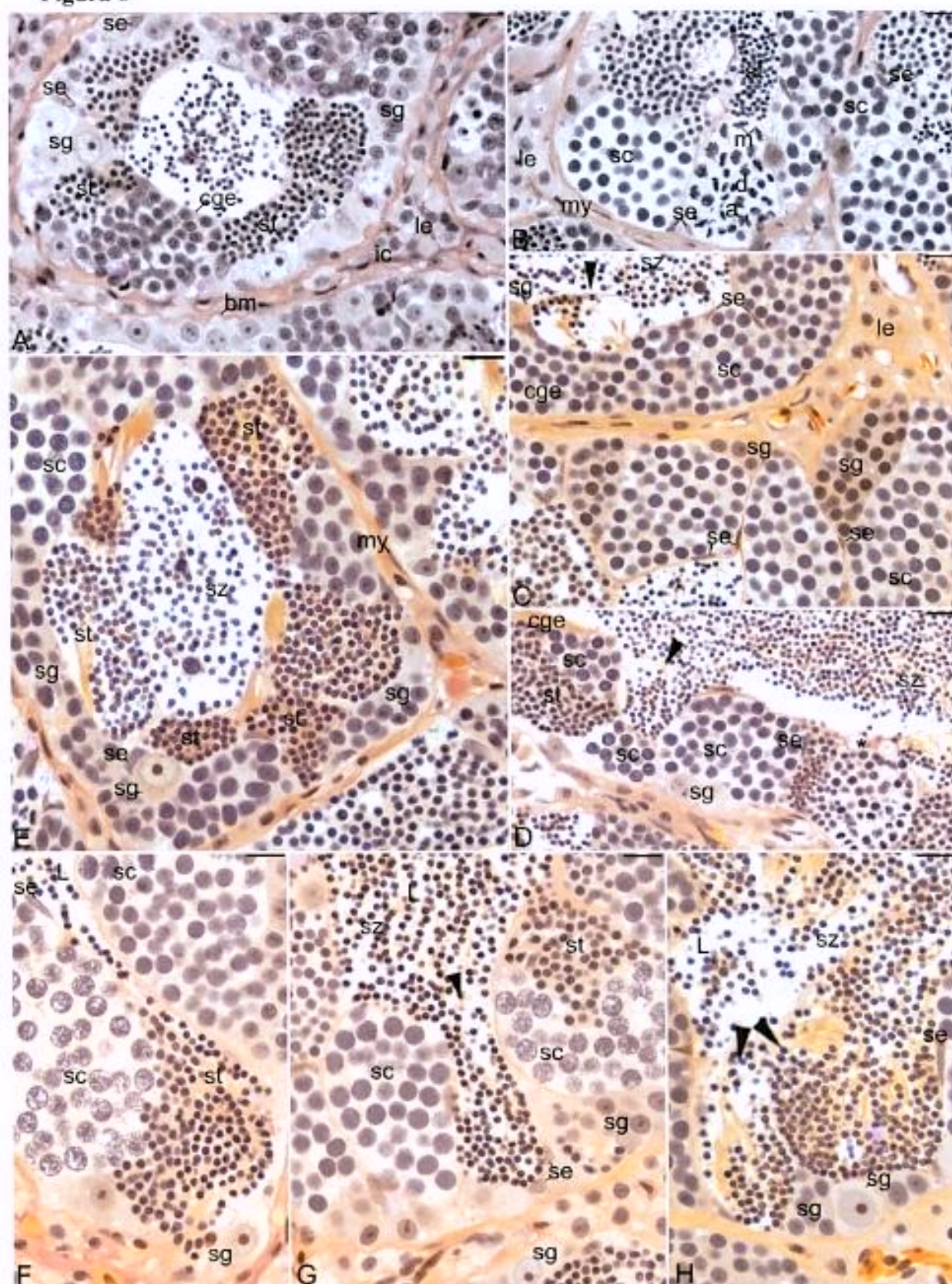
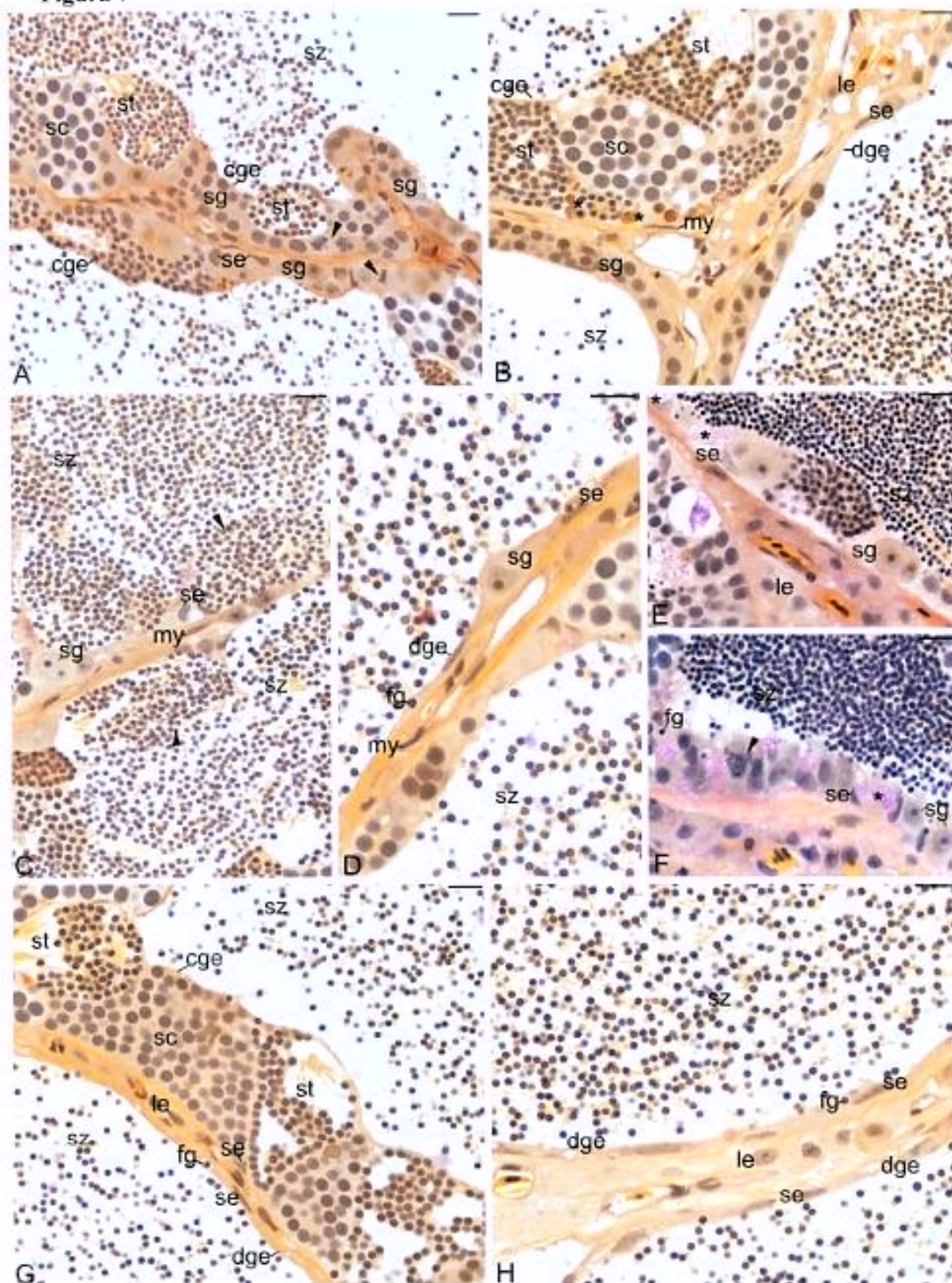


Figura 7. Cinética do epitélio germinativo de *S. spilopleura*. **A-H:** PAS+Hematoxilia+Metanil Yellow. **A:** Nas regiões com estrato basal, a espermição resulta em um epitélio germinativo contínuo (cge) formado predominantemente por cistos de espermatogônias (sg). A atividade mitótica das espermatogônias é intensa como indicado pelas cabeças de seta. Cistos de espermatócitos (sc) e espermátides (st) também são observados. **B:** A região apresenta epitélio germinativo contínuo (cge) e descontínuo (dge). O epitélio contínuo pode ser formado apenas por cistos de espermatogônias (sg) ou apresentar cistos de espermatócitos (sc) e espermátides (st) com certa estratificação. Notar apoptoses de células germinativas (asteriscos). Células de Leydig (le) e células mioide (my) são observadas. **C,D:** As descontinuidades são freqüentes na região cortical do testículo. As espermições (cabeças de seta) resultam em um epitélio descontínuo, formado por células de Sertoli (se) entremeadas a cistos isolados de espermatogônias (sg). Notar que a luz é repleta de espermatozoides (sz). **E,F:** Observar vacuolizações PAS positivas (asteriscos) e fagossomos (fg) no citoplasma das células de Sertoli (se). A atividade mitótica das espermatogônias (sg) é indicada pela cabeça de seta. **G,H:** Epitélio germinativo descontínuo (dge) formado por apenas células de Sertoli (se). As células de Sertoli são achatadas e possuem fagossomos (fg) em seu citoplasma. Epitélio germinativo contínuo (cge) constituído por uma monocamada de cistos (sc, espermatócitos; st, espermátides) também é observado. A-H. Barra = 10µm.

Figura 7



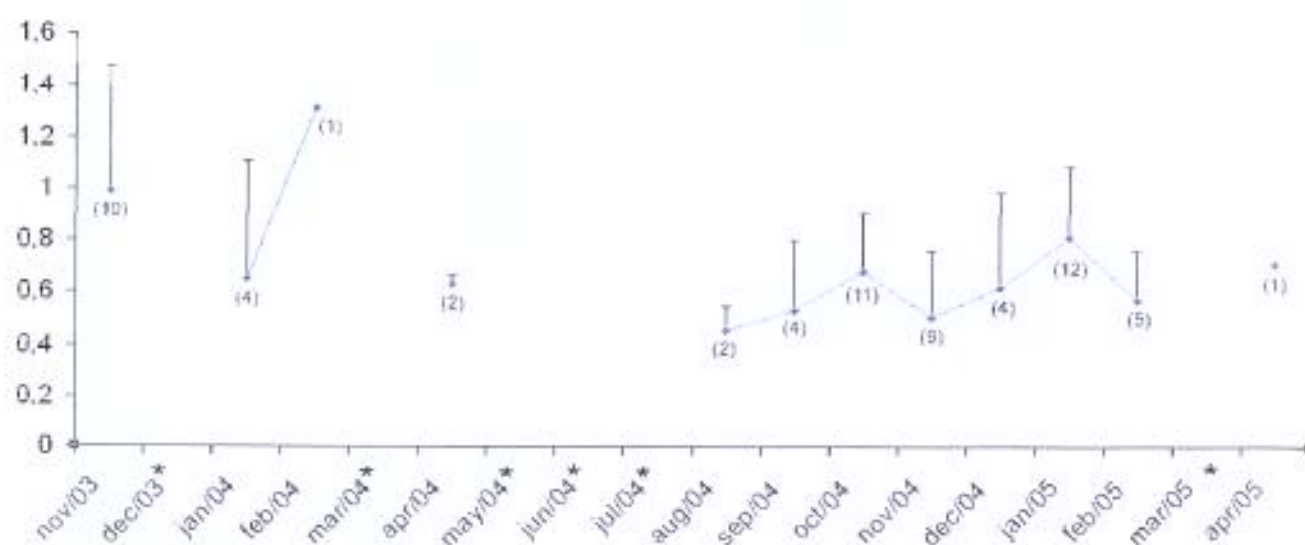


Figura 8. IGS de *S. spilopleura*. A amostragem ocorreu durante novembro/2003 à abril/2005, totalizando 65 exemplares. O número de indivíduos coletados mensalmente está indicado entre parênteses. Os meses com asterisco indicam que os indivíduos não foram coletados no período. A média dos valores de IGS de cada mês e seu correspondente desvio padrão estão plotados no gráfico. Os valores são apenas descritivos (sem nenhuma análise estatística) e permitem definir dois grupos de desenvolvimento testicular; um em que o IGS não oscila, e outro em que o IGS é elevado.

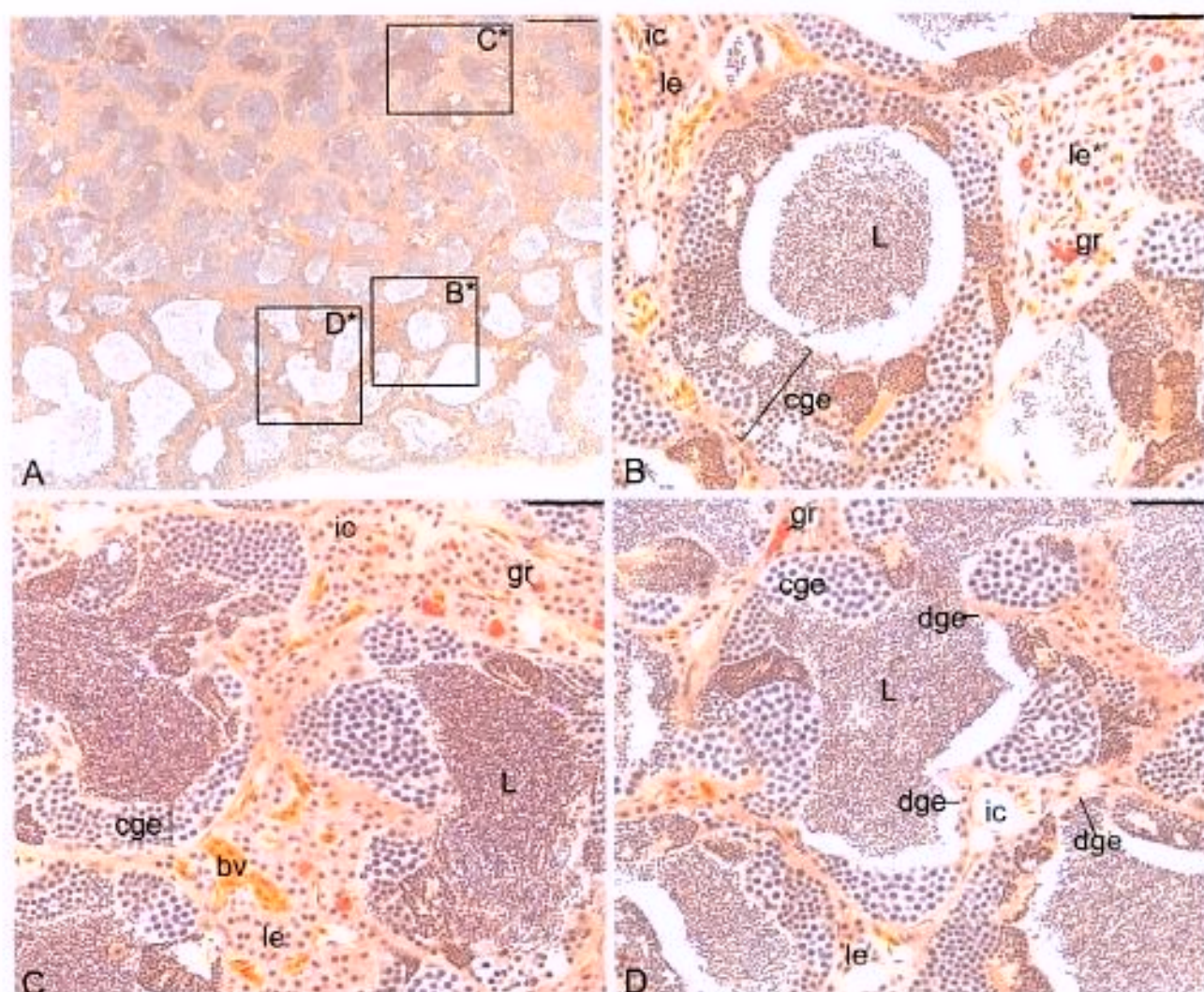


Figura 9. Ciclo reprodutivo de *S. spilopleura*: testículo correspondente ao período em que o IGS não varia. **A-D:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **A:** O testículo apresenta duas regiões nítidas: medular (espermatogênica) e cortical (espermatogênica e de armazenamento). As delimitações B* e D* correspondem à região cortical e C* à medular. Barra = 200µm. **B:** A região cortical possui epitélio germinativo contínuo e estratificado (observar a altura do epitélio), com luz (L) repleta de espermatozoides. Notar que o compartimento intersticial (ic) é formado por grande quantidade de células de Leydig (le) e por granulócitos (gr). Provavelmente as células de Leydig exibem diferentes morfologias (le*). Barra = 50µm. **C:** A região medular é pouco ramificada e possui epitélio germinativo contínuo (cge) com predominância de espermatócitos e espermátides. O compartimento intersticial (ic) é rico em células de Leydig (le), vasos sanguíneos (bv) e granulócitos (gr). Barra = 50µm. **D:** Epitélio germinativo descontínuo com luz (L) irregular e repleta de espermatozoides (sz) também ocorre na região cortical. Nessa região, o compartimento intersticial (ic) é reduzido, com poucas células de Leydig (le) e granulócitos (gr). Barra = 50µm.

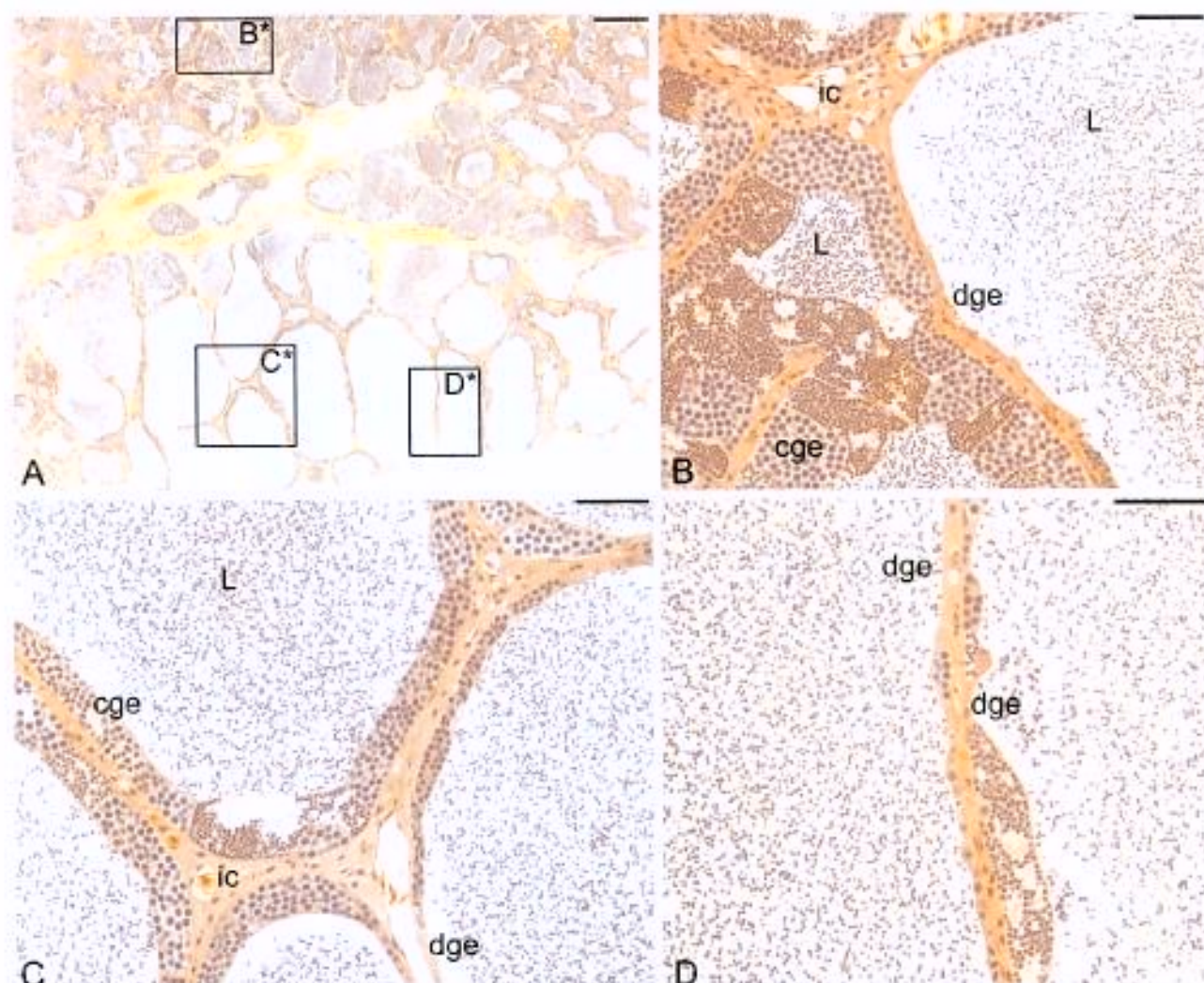


Figura 10. Ciclo reprodutivo de *S. spilopleura*: testículo correspondente ao período em que o IGS é elevado. **A-D:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **A:** A região cortical é mais desenvolvida e apresenta luz (L) larga e repleta de espermatozoides. As delimitações C* e D* correspondem à região cortical e B* à medular. Barra = 300µm. **B:** A região medular tem epitélio germinativo contínuo (cge) (com predominância de cistos de espermatócitos e espermátides) e epitélio descontínuo (dge). Notar o compartimento intersticial (ic) reduzido. Barra = 50µm. **C,D:** O epitélio germinativo descontínuo (dge) é predominante na região cortical. Epitélio germinativo contínuo (cge) (sem estratos e com espermatócitos e espermátides) também foi documentado em C. Barra = 50µm.

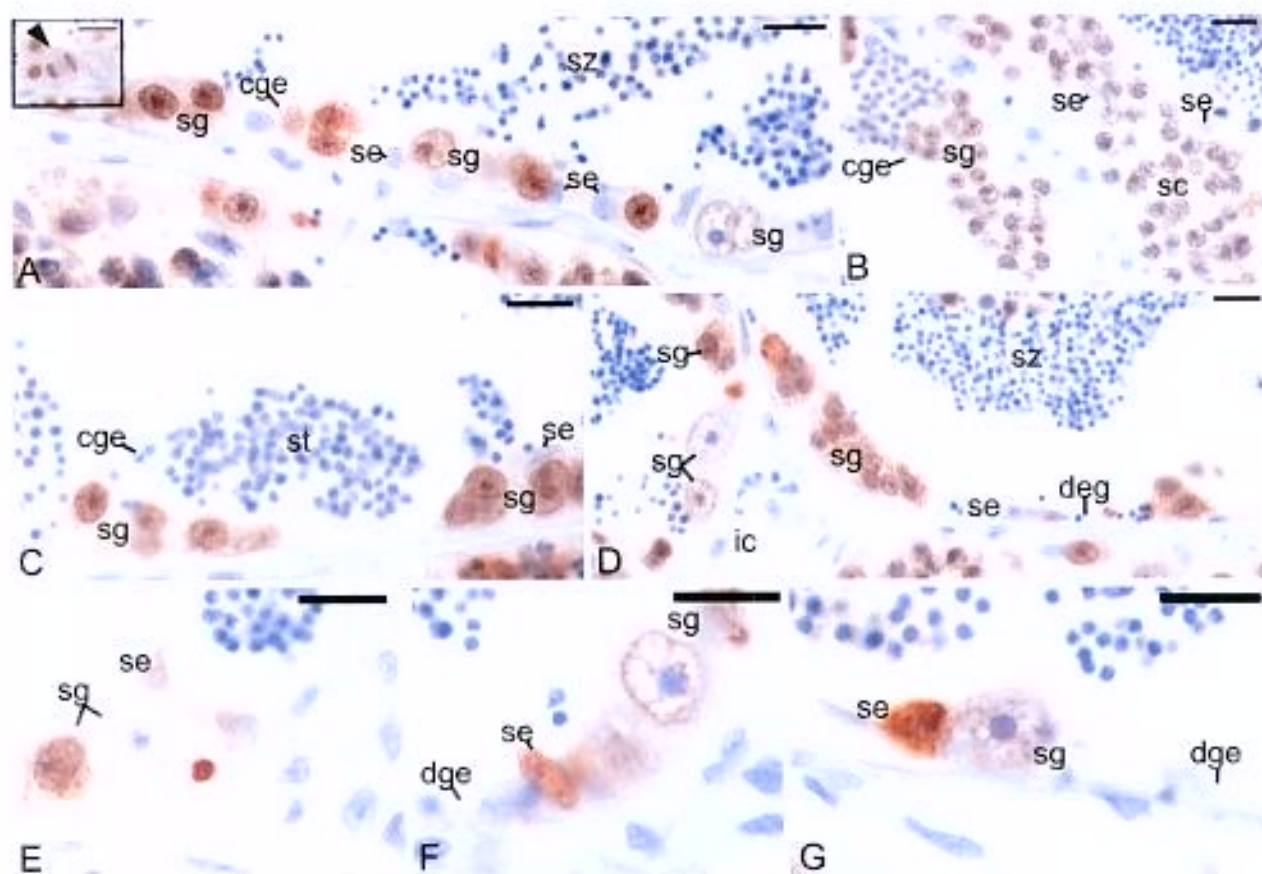


Figura 11. Proliferação durante a cinética do epitélio germinativo de *S. spilopleura*. **A-G:** PCNA. **A:** Durante a fase de proliferação, o epitélio germinativo é contínuo (cge) e apenas as espermatogônias (sg) têm marcação ao PCNA. Notar que a marcação concentra-se no núcleo das espermatogônias. No inset, a cabeça de seta mostra uma figura mitótica (anáfase). Espermatozoides (sz) são observados na luz do compartimento germinativo. **B:** Na meiose, as marcações do PCNA ocorrem nos núcleos das espermatogônias (sg) e dos espermatócitos (sc). As células de Sertoli (se) não proliferam durante a meiose. **C:** As espermatogônias (sg) basais proliferam e formam um estrato basal em alguns trechos do epitélio germinativo. Observar cistos apicais de espermátides (st). **D-G:** Epitélio germinativo descontínuo (dge): formado por células de Sertoli (se) entremeadas por poucos e isolados cistos de espermatogônias, que podem ou não responder ao PCNA. Algumas espermatogônias apresentam marcação citoplasmática ao PCNA. As células de Sertoli (se) proliferam quando estão isoladas (F) ou em associação à cistos de espermatogônias que não estão em divisão (E,G). A-G. Barra = 10µm.

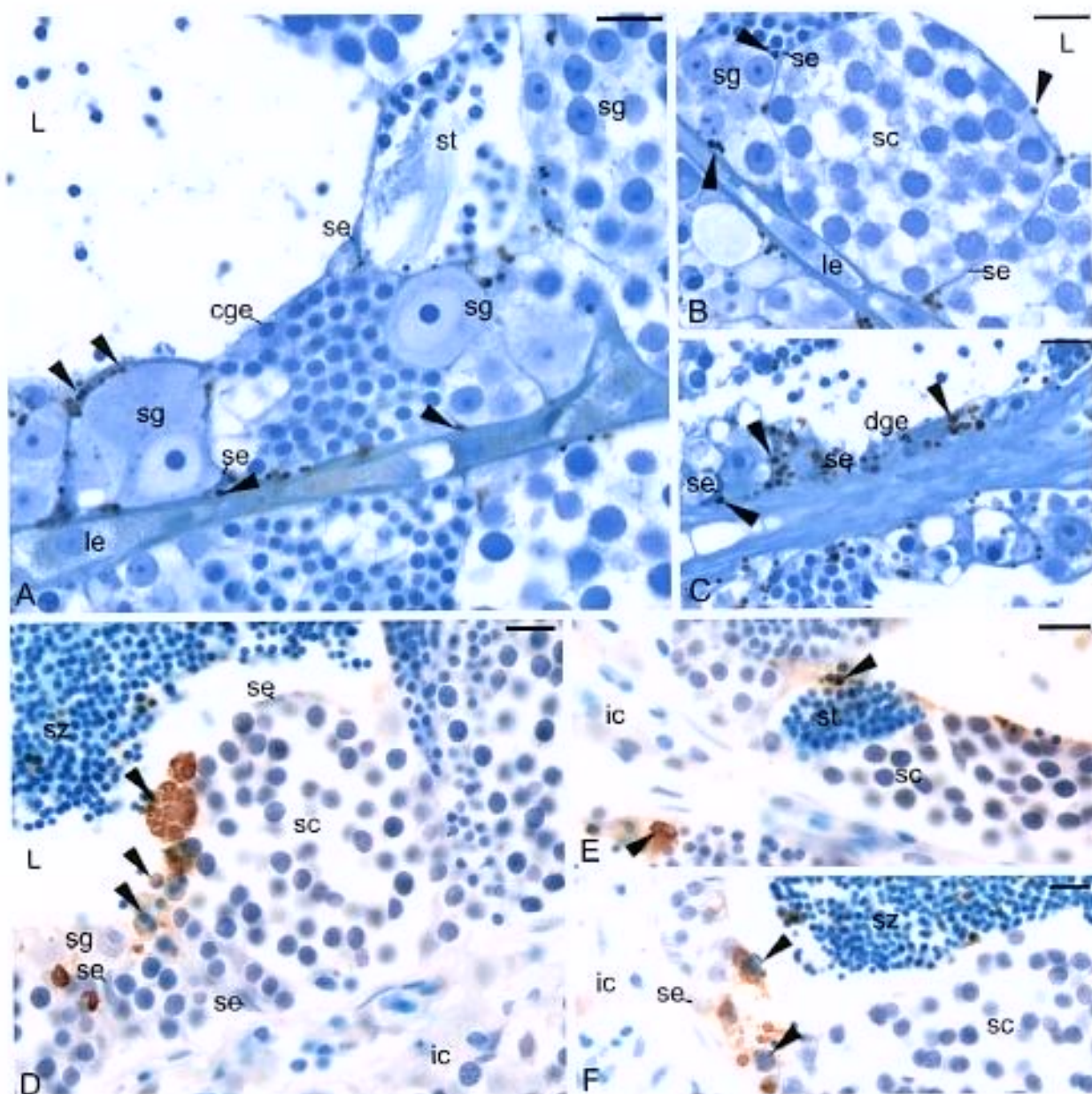


Figura 12. Morte celular e detecção de lipídios no epitélio germinativo de *S. spilopleura*. **A-C:** Ósmio-Imidazol; **D-F:** TUNEL. **A-C:** As inclusões de lipídios (cabeças de seta) ocorrem no citoplasma das células de Sertoli (se), em especial no epitélio germinativo descontínuo (dge). Notar que as células de Leydig (le) não apresentam inclusões de lipídios. **D-F:** As cabeças de seta indicam apoptoses das células germinativas. As apoptoses são fagocitadas pelas células de Sertoli (se). ic, compartimento intersticial; cge, epitélio germinativo contínuo; sc, espermatócitos; sg, espermatogônias; sz, espermatozóides; st, espermátides; L, luz do compartimento germinativo. A-F. Barra = 10µm.

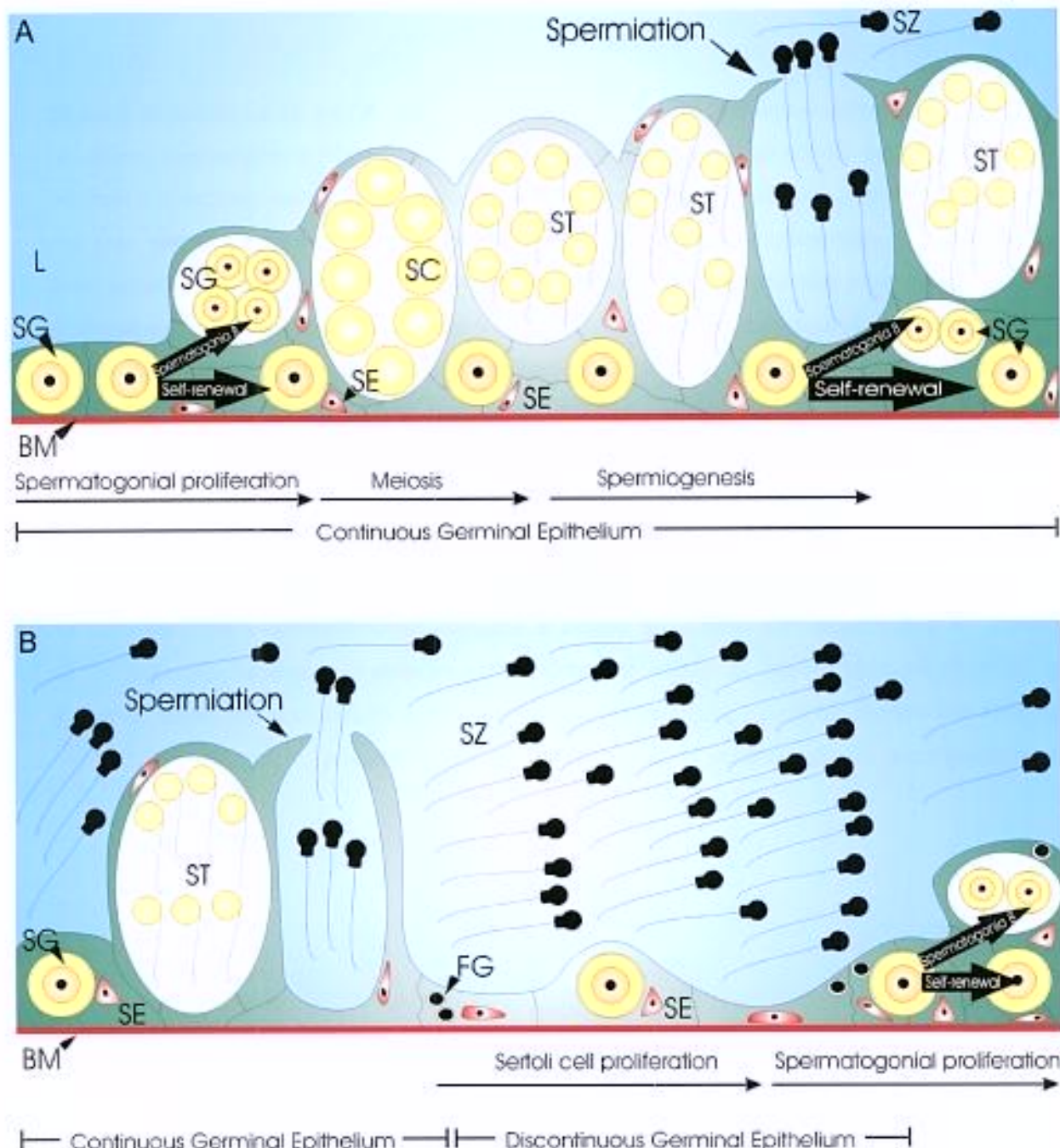


Figura 13. Epitélio germinativo de *S. spilopleura*. **A:** O epitélio germinativo é formado por células germinativas (SG, espermatogônias; SC, espermatócitos; ST, espermátides) e por células de Sertoli (SE), que estão organizadas em cistos. A espermatogênese ocorre no interior dos cistos e durante suas principais etapas (proliferação espermatogonial, meiose dos espermatócitos, espermiogênese e espermição), as células germinativas e as células de Sertoli passam por modificações morfológicas que também se refletem no estado e na funcionalidade do epitélio germinativo (contínuo e descontínuo). O epitélio contínuo é formado por cistos que se estendem ao longo de toda a membrana basal (BM). Trata-se de um epitélio ativo, com constante produção de células

germinativas. Reporta-se aqui o epitélio germinativo estratificado. A base da estratificação depende da organização das células de Sertoli. Uma única célula de Sertoli emite projeções para formar, ao mesmo tempo, cistos apicais de células germinativas (em desenvolvimento avançado) e também cistos basais de espermatogônias. Dessa forma, a espermição dos cistos apicais não gera um epitélio descontínuo, mas sim um epitélio contínuo e formado principalmente por espermatogônias que reiniciam o ciclo espermatogênico. A estratificação é considerada uma estratégia para manter a produção de espermatozoides (SZ) constante (espermatogênese contínua). **B:** Na ausência de estratos basais, a espermição gera um epitélio descontínuo, formado por trechos de células de Sertoli entremeados por cistos isolados de espermatogônias. O epitélio descontínuo é freqüente na região cortical do testículo. Trata-se de um epitélio que deixa de produzir células germinativas e assume função de armazenamento de espermatozoides. As células de Sertoli proliferam no epitélio descontínuo, quando estão isoladas ou em associação à cistos de espermatogônias que não estão em divisão. A proliferação das células de Sertoli é separada temporalmente e espacialmente da proliferação espermatogonial; as células de Sertoli proliferam antes das espermatogônias, a fim de garantir um número adequado para acompanhar e acomodar o crescimento dos cistos durante a espermatogênese. FG, fagossomos; L, luz do compartimento germinativo.

**ULTRA-ESTRUTURA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA (3 β -HSD E FOSFATASE ÁCIDA)
DAS CÉLULAS DE LEYDIG DURANTE A ESPERMATOGÊNESE CONTÍNUA DE
SERRASALMUS SPILOPLEURA (CHARACIFORMES: CHARACIDAE).**

Resumo

Serrasalmus spilopleura é uma espécie de teleósteo de reprodução contínua, isto é, produz e libera gametas de forma constante durante o ciclo reprodutivo. O testículo não passa por alterações morfológicas durante o ciclo, mas exhibe sazonalidade estrutural: região medular (espermato gênica e de epitélio germinativo contínuo) e região cortical (armazenamento de espermatozóides e epitélio germinativo descontínuo). Nessas duas regiões, as células de Leydig foram caracterizadas através de sua ultra-estrutura e correlacionadas com sua atividade 3 β -HSD. Na região medular, as células de Leydig possuem intensa atividade 3 β -HSD e características estruturais típicas de células produtoras de esteróides, como retículo endoplasmático liso abundante e numerosas mitocôndrias de cristas tubulares. Diferentes populações de células de Leydig também são documentadas nessa região. Essas populações variam em características citoplasmáticas e nucleares, e sugerem diferentes etapas na biossíntese e controle dos hormônios esteróides. Esse fato é condizente ao modelo de reprodução contínua, uma vez que a coexistência das diferentes etapas da espermatogênese requer diferentes tipos de andrógenos. Na região cortical, as células de Leydig exibem baixa atividade 3 β -HSD e características de degeneração, demonstradas pela ultra-estrutura e intensa atividade da fosfatase ácida. Essas características sugerem, pelo menos, morte celular das células de Leydig ou remodelação citoplasmática em resposta a um feedback negativo. Em virtude da organização estrutural e funcional, *S. spilopleura* constitui-se um interessante modelo para estudos do controle da esteroidogênese nos peixes teleósteos.

Introdução

As células de Leydig dos teleósteos, assim como dos demais vertebrados, encontram-se no interstício, de forma isolada ou em grupos, e geralmente próximas aos

vasos sanguíneos (Pudney, 1999). Nos teleósteos, o potencial esteroidogênico das células de Leydig tem sido evidenciado através de sua ultra-estrutura, típica de célula esteroidogênica, e pela detecção enzimática da 3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) (Marshall & Lofts, 1956; Yaron, 1966; van den Hurk et al., 1978; Shanbhag & Nadkarni, 1979; Cruz-Höfling & Cruz-Landim, 1984; Borges Filho, 1987; Silva, 1987; Grier et al., 1989; van Vuren & Soley, 1990; Cauty & Loir, 1995; Cinquetti & Dramis, 2003; Lo Nostro et al., 2004; García-López et al., 2005). Recentemente, estudos *in vitro* (Loir, 1990a,b) e o desenvolvimento de anticorpos específicos para a via esteroidogênica dos peixes (Kobayashi et al, 1996, 1998), também confirmam as observações supracitadas: as células de Leydig são os principais sítios de produção de andrógenos nos testículos dos teleósteos.

A correlação da ultra-estrutura das células de Leydig com sua atividade esteroidogênica é reportada para poucos teleósteos gonocorísticos (Loir, 1990b; Cinquetti & Dramis, 2003) e protogínicos (Yeung et al., 1985; Lo Nostro et al., 2004). Em geral, nos mamíferos e teleósteos, a síntese de andrógenos correlaciona-se positivamente com células de Leydig que possuem retículo endoplasmático liso desenvolvido e numerosas mitocôndrias com matriz elétron-densa e cristas tubulares (Ewing & Zirkin, 1983; Loir, 1990b; Yeung et al., 1985; Cinquetti & Dramis, 2003; Lo Nostro et al., 2004).

Em geral, os peixes teleósteos exibem reprodução sazonal, na qual as células de Leydig passam por modificações morfológicas e funcionais durante o ciclo espermatogênico (Borges Filho, 1987; Van Vuren & Soley, 1990; Cauty & Loir, 1995; Cinquetti & Dramis, 2003). Nos peixes estudados, durante o período de reprodução, as células de Leydig secretam grandes quantidades de andrógenos, necessários para a espermatogênese e para o desenvolvimento das características sexuais secundárias (Pudney, 1999). Após a reprodução, ao final do ciclo reprodutivo, as células de Leydig apresentam alterações citoplasmáticas, como mitocôndrias com alterações, intensa vacuolização e lisossomos (Van Vuren & Soley, 1990; Cauty & Loir, 1995; Cinquetti & Dramis, 2003).. Essas características são acompanhadas pela redução da atividade da 3 β -HSD e diminuição dos esteróides plasmáticos ao final do ciclo reprodutivo (Shanbhag & Nadkarni, 1979; van den Hurk et al., 1978; Borges Filho, 1987; Cuevas et al., 1993; Cinquetti & Dramis, 2003;

Lo Nostro et al., 2004). No entanto, até o presente momento, não existem informações sobre a atividade 3 β -HSD e sua correlação com a ultra-estrutura das células de Leydig durante o ciclo de teleósteos de reprodução contínua.

Serrasalmus spilopleura (Ostariophysi, Characiformes, Characidae), conhecida como pirambeba, é uma espécie de boa adaptação a ambientes lênticos (Leão, 1996; Schleser, 1997). Não é migradora e encontra-se nos principais reservatórios brasileiros, onde sua reprodução é contínua e mais intensa nas épocas de chuvas (Lamas & Godinho, 1996; Fujihara, 1997; Teles & Godinho, 1997).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar a atividade 3 β -HSD durante o ciclo reprodutivo e correlacioná-la com a ultra-estrutura das células de Leydig durante a espermatogênese contínua de *S. spilopleura*. Além disso, pretende-se verificar a relação da atividade 3 β -HSD com a atividade fosfatásica ácida (marcador de lisossomos) no citoplasma das células de Leydig.

Material e Métodos

Os animais

Machos adultos de *S. spilopleura* foram coletados, mensalmente, no rio Piracicaba (Município de Santa Maria da Serra, Estado de São Paulo, Brasil), durante o período de novembro de 2003 a abril de 2005, somando ao todo 65 exemplares. Os animais foram anestesiados com 0,1% de benzocaína, pesados e seus comprimentos mensurados. Em seguida, os animais foram sacrificados por decapitação e seus testículos rapidamente removidos, pesados e imersos em solução fixadora apropriada para cada metodologia. Os procedimentos adotados estão de acordo com o Comitê de Ética Animal e IBAMA.

Histoquímica enzimática da 3 β -HSD

A enzima 3 beta-hidroxisteróide desidrogenase (3 β -HSD) está envolvida em diversas etapas da biossíntese dos hormônios esteróides (Fig. 1). É responsável pelas conversões: (1) pregnenolona em progesterona; (2) 17 α -hidroxipregnenolona em 17 α -hidroxiprogesterona; (3) dehidroepiandrosterona em androstenediona; e (4) androstenediol em testosterona (Fig. 1) (Kime, 1993; Kobayashi et al., 1996).

A 3 β -HSD atua na hidroxila (OH), ligada em posição beta ao carbono 3 do esteróide (Fig. 2). Em uma primeira etapa, a enzima oxida a hidroxila (OH), que ao ceder seus elétrons, converte-se em um grupamento cetona (=O) (Fig. 2). Nessa reação de oxidorredução, o NAD⁺ (forma oxidada) recebe os elétrons da OH e passa para sua forma reduzida (NADH) (Fig. 2). Em uma segunda etapa, a 3 β -HSD age como uma isomerase, isto é, transfere a dupla ligação do carbono 5 para o carbono 4 do esteróide, convertendo assim os hidroxiesteróides Δ^5 em Δ^4 (Fig. 2).

A localização *in situ* da 3 β -HSD e conseqüentemente das células esteroidogênicas de *S. spilopleura* foi conduzida através de histoquímica enzimática segundo protocolo modificado de Borges Filho (1987) e Lo Nostro e colaboradores (2004). O princípio do método é fazer a enzima do tecido (3 β -HSD) oxidar um substrato fornecido (esteróide). O meio de incubação contém: dehidroepiandrosterona, NAD⁺ (beta nicotinamida dinucleotídeo – forma oxidada) e sal de tetrazólio (Nitro Blue Tetrazolium - NBT). Com a oxidação do esteróide, o NAD⁺ recebe elétrons e passa para a forma reduzida, NADH, que por sua vez é capaz de reduzir o NBT. A forma reduzida do NBT (formazan) é insolúvel e de coloração azul-arroxeadas, que permite identificar o local da reação enzimática. Fragmentos de testículos de *S. spilopleura* foram criopreservados em soluções crescentes de sacarose; rapidamente congelados em nitrogênio líquido e acondicionados em freezer (-80°C) até o momento da reação. O material congelado foi seccionado em criostato (5 μ m de espessura) e incubado por 2h (37°C) em meio contendo: 11,9 ml de tampão fosfato (pH 7,6); 900 μ l de nitro blue tetrazolium (NBT) (preparado com 1,0mg dissolvido em 1 ml de água destilada); 600 μ l de substrato (preparado com 4mg de dehidroepiandrosterona dissolvidos em 1ml de dimetilsulfóxido - DMSO) e 20,0mg de NAD⁺. Após incubação, o material foi lavado em tampão fosfato, fixado em formol Ca⁺² e montado em gelatina. Como controle negativo, algumas lâminas foram incubadas em (a) meio sem esteróide ou em (b) meio sem NAD⁺. A documentação foi feita em sistema computadorizado para análise de imagens (Leica Qwin 2.5).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Fragmentos de testículos foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. O material foi pós-fixado por 2h no escuro com 1% de tetróxido de ósmio no mesmo tampão, contrastado em bloco com solução aquosa de 5% de uranila por 2 horas, desidratado em acetona, embebido em araldite, seccionado e contrastado com solução saturada de acetato de uranila em 50% de álcool e citrato de chumbo. Os exemplares foram examinados e documentados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips – CM 100.

Citoquímica ultra-estrutural: detecção enzimática da fosfatase ácida (AcPase)

Fragmentos de testículo foram fixados em solução de glutaraldeído 1% em tampão cacodilato de sódio (0,1M a pH 7,2) por uma hora a 4°C. O material foi lavado no mesmo tampão e incubado por uma hora (37°C) em meio contendo: 25mg de citidina-5'-monofosfato, 12ml de água destilada, 10ml de tampão acetato (0,05M a pH 5,0) e 3ml nitrato de chumbo 1%. Como controle negativo, alguns fragmentos foram incubados sem o substrato da reação (citidina-5'-monofosfato). Após incubação, o material foi novamente fixado em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1M a pH 7,2), pós-fixado por 2 horas no escuro com 1% de tetróxido de ósmio no mesmo tampão, lavado várias vezes no mesmo tampão, contrastado em bloco com solução aquosa de 2% de uranila por 2 horas, desidratado em acetona e incluído em araldite. Os fragmentos foram seccionados, examinados (sem pós-contrastação) e documentados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips – CM 100.

Resultados

Histoquímica enzimática (3 β -HSD)

A enzima 3 β -HSD ocorre no compartimento intersticial de *S. spilopleura*, com diferentes intensidades entre as duas regiões principais do testículo: medular (Fig. 3a) e cortical (Fig. 3e). Na região medular, a atividade da 3 β -HSD é intensa e ocorre no citoplasma das células de Leydig (Fig. 3a,b). As células de Leydig são abundantes (Fig. 3b,c) e acumulam-se preferencialmente nas áreas de confluência do compartimento germinativo (Fig. 3b,c). A reação da 3 β -HSD também é positiva nas bordas dos cistos (Fig.

3b,d) e ao redor das células germinativas (Fig. 3b,d). Na região cortical, a reação da 3 β -HSD diminui e apresenta-se difusa pelo compartimento intersticial (Fig. 3e,f). O interstício torna-se reduzido e as células de Leydig são difíceis de serem visualizadas (Fig. 3e,f).

Ultra-estrutura das células de Leydig

As células de Leydig de *S. spilopleura* são encontradas próximas a vasos sanguíneos (Fig. 4a) e possuem núcleo levemente excêntrico, com contorno irregular, heterocromatina difusa e nucléolo evidente (Fig. 4c,g,h,k). O citoplasma apresenta retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e grande quantidade de mitocôndrias com cristas tubulares (Fig. 4c-f,g-i,j,k). Nas regiões em que o epitélio germinativo é contínuo, diferentes populações de células de Leydig coexistem no interstício de *S. spilopleura* (Fig. 4a,g,j). As populações de células de Leydig variam em características citoplasmáticas e nucleares, como: 1) forma e elétrondensidade das mitocôndrias (Fig. 4c-k); 2) morfologia das cristas tubulares das mitocôndrias (Fig. 4e,i); 3) quantidade e dilatação das cisternas do retículo endoplasmático liso (Fig. 4b-d,f,j,k); 4) dilatação do espaço perinuclear (distanciamento entre as duas membranas do envoltório nuclear) (Fig. 4b,c,f-h,j,k). As células de Leydig de *S. spilopleura* interagem com granulócitos (Fig. 4l); com nervos amielínicos (Fig. 4l) e com células mióides (Fig. 5g). Fibras de colágeno, células mióides e nervos mielínicos também são documentados no interstício de *S. spilopleura* (Fig. 4d,g,h,j,5f-j).

Com a espermição (liberação dos espermatozoides) e a não reposição imediata das células germinativas, o epitélio germinativo torna-se descontínuo e caracterizado por trechos de células de Sertoli entremeados por cistos isolados de espermatogônias (Fig. 5a-c). Nessas regiões, o interstício é representado por diferentes populações de células de Leydig que possuem constantes sinais de alteração (Fig. 5b,d,g-j) e intensa associação com macrófagos (Fig. 5e-g). Os sinais de alteração são: 1) mitocôndrias com lesão e figuras de mielina (Fig. 5b,d,g); 2) acúmulo gradual de vesículas de conteúdo amorfo, heterogêneo e elétrondensidade variável (Fig. 5g-i, 6a,b) e 3) núcleo mais condensado (Fig. 5j,6a).

Fosfatase ácida (AcPase)

As células de Leydig da região cortical, com sinais de degeneração, exibem intensa atividade para fosfatase ácida no núcleo, nas mitocôndrias e em algumas vesículas (Fig. 6c,d,e). As vesículas com intensa marcação para fosfatase ácida são lisossomos, enquanto que as vesículas menores com pouca marcação são consideradas provenientes do complexo de Golgi (Fig. 6f,g). As mitocôndrias são incorporadas gradativamente por um sistema de endomembranas, ao qual parecem fundir as vesículas contendo fosfatase ácida (Fig. 6f,g). As mitocôndrias apresentam marcações pontuais para fosfatase ácida em sua matriz e cristas mitocondriais (Fig. 6f,g). O quadro a seguir resume os resultados encontrados na região medular e cortical.

Quadro resumido dos resultados.

	Função predominante	Células de Leydig	3β-HSD	Fosfatase Ácida (AcP)
Região Medular	Espermatogênica	REL bem desenvolvido, mitocôndrias de cristas tubulares, espaço perinuclear dilatado	+++	Ausente
Região Cortical	Espermiação	Núcleo mais condensado, muitos vacúolos, figuras de mielina, mitocôndrias danificadas	+	+++ Núcleo, vacúolos, e mitocôndrias

Nota: reação intensa (+++); reação fraca (+).

Discussão

As células de Leydig de *S. spilopleura*, assim como dos demais teleósteos, localizam-se no interstício, de forma isolada ou em grupos, e geralmente próximas aos vasos sanguíneos (Pudney, 1999). No entanto, a localização das células de Leydig pode variar em alguns teleósteos como *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), em que as células de Leydig concentram-se na periferia do testículo, em geral, ao redor do ducto testicular (Pudney, 1999). Em outros teleósteos como *Glossogobius olivaceus* (Perciformes: Gobiidae), as células de Leydig formam uma massa glandular central, separada do compartimento germinativo; e em *Gobius niger* (Perciformes: Gobiidae), as células de Leydig acumulam-se no mesórquio do testículo (Pudney, 1999).

Em *S. spilopleura*, a capacidade esteroidogênica das células de Leydig é comprovada através de sua ultra-estrutura, característica de célula esteroidogênica, com retículo endoplasmático liso abundante e mitocôndrias de cristas tubulares; e pela detecção da enzima 3 β -HSD. Apesar da lipofilia também ser uma característica indicativa de célula produtora de esteróides, as células de Leydig de *S. spilopleura*, assim como da maioria dos peixes teleósteos (Guraya, 1976; Guraya, 2001), não apresenta inclusões de lipídio.

Estudos de histoquímica enzimática também reportam a atividade da 3 β -HSD nas células de Sertoli dos teleósteos *Cymatogaster aggregata* (Perciformes: Embiotocidae) (Wiebe, 1969); *Fundulus heteroclitus* (Cyprinodontiformes: Fundulidae) (Bara, 1969); *S. gairdneri* (Salmoniformes: Salmonidae) (van den Hurk et al., 1978) e no testículo em repouso de *P. scrofa* (Characiformes: Prochilodontidae) (Borges Filho, 1987). No entanto, com o uso de anticorpos específicos para a via esteroidogênica dos peixes, Kobayashi e colaboradores (1996, 1998) não encontram marcação para as células de Sertoli nos testículos imaturos e maduros de *O. niloticus* (Perciformes: Cichlidae) e *O. mykiss* (Salmoniformes: Salmonidae). Em *S. spilopleura*, a atividade da 3 β -HSD também foi encontrada nas bordas dos cistos e ao redor das células germinativas. A interpretação desses resultados e das observações supracitadas devem ser melhor investigadas antes de qualquer conclusão a respeito da capacidade esteroidogênica das células de Sertoli nos peixes teleósteos.

Nos teleósteos de reprodução sazonal, a atividade da 3 β -HSD é baixa nos testículos regredidos (repouso), isto é, nos testículos constituídos apenas por espermatogônias e células de Sertoli (Cinquetti & Dramis, 2003). Com a espermatogênese, a 3 β -HSD tem sua atividade aumentada, porém começa a diminuir após a liberação dos espermatozóides e chega a ser imperceptível durante o preparo da gônada para o próximo ciclo (regressão) (Cinquetti & Dramis, 2003; Lo Nostro et al., 2004). O comportamento da 3 β -HSD está de acordo com os níveis plasmáticos de testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11KT) durante o ciclo reprodutivo de machos de *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) (Roberts et al., 1999) e *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes: Characidae) (Gazola & Borella, 1997), que possuem elevadas concentrações de T e 11KT durante a maturação,

com queda após a liberação dos espermatozóides e baixas concentrações durante a regressão e a classe regredida (repouso).

A reação da 3 β -HSD nas diferentes regiões (medular e cortical) do testículo de *S. spilopleura* correlaciona-se à atividade da enzima durante o ciclo dos teleósteos de reprodução sazonal. Na região medular (espermatogênica), a atividade 3 β -HSD é intensa, e corrobora o fato da espermatogênese ser um processo altamente dependente de andrógenos (Miura & Miura, 2003). Na região cortical (armazenamento - espermição), a atividade 3 β -HSD é menor e encontra-se dispersa pelo interstício, sugerindo que a liberação dos espermatozóides é um processo que não depende tanto dos andrógenos quanto a espermatogênese. Apesar da sazonalidade estrutural, o comportamento da 3 β -HSD manteve-se estável durante o ciclo reprodutivo de *S. spilopleura*.

As células de Leydig passam por alterações estruturais e funcionais durante o ciclo dos teleósteos de reprodução sazonal (Borges Filho, 1987; Van Vuren & Soley, 1990; Cauty & Loir, 1995; Cinquetti & Dramis, 2003). Durante a regressão e nos testículos regredidos (repouso) de *O. mykiss* (Salmoniformes: Salmonidae), Cauty & Loir (1995) documentam células intersticiais com características intermediárias de fibroblastos e de células de Leydig. Durante a maturação (espermatogênese), as células de Leydig apresentam citoplasma completamente diferenciado; retículo endoplasmático liso abundante e numerosas mitocôndrias de cristas tubulares (Borges Filho, 1987; Cauty & Loir, 1995; Cinquetti & Dramis, 2003). Com a liberação dos espermatozóides e durante a regressão, as células de Leydig exibem sinais de degeneração como núcleo mais condensado; mitocôndrias grandes, alteradas e com poucas cristas; grande quantidade de lisossomos; figuras de mielina; intensa vacuolização e geralmente estão associadas a macrófagos (Van Vuren & Soley, 1990; Cauty & Loir, 1995; Cinquetti & Dramis, 2003). As alterações nas células de Leydig acompanham a diminuição dos níveis de esteróides plasmáticos ao final do ciclo reprodutivo (Scott & Sumpter, 1989; Roberts et al., 1999; Gazola & Borella, 1997). A correlação dos sinais de degeneração com a capacidade esteroidogênica diminuída também é observada em *O. mykiss* (Salmoniformes: Salmonidae) (Loir, 1990b), *M. albus* (Synbranchiformes: Synbranchidae) (Yeung et al., 1985) e durante a regressão testicular de alguns mamíferos (Tähkä, 1988).

Em *S. spilopleura*, as características das células de Leydig são semelhantes às alterações sofridas pelas células de Leydig durante o ciclo dos teleósteos de reprodução sazonal. Na região medular (espermatogênica), as células de Leydig possuem características estruturais típicas de células esteroidogênicas, em semelhança às células de Leydig dos testículos em maturação (Cauty & Loir, 1995; Cinquetti & Dramis, 2003). Entretanto, diferentes populações de células de Leydig coexistem nessa região do testículo de *S. spilopleura*. Essas populações variam quanto a características citoplasmáticas e nucleares, como: tamanho, forma e elétron-densidade das mitocôndrias; quantidade e morfologia das cristas tubulares das mitocôndrias; quantidade de retículo endoplasmático liso; dilatação das cisternas do retículo endoplasmático liso e dilatação do espaço perinuclear (distanciamento entre as duas membranas do envoltório nuclear).

Cavaco e colaboradores (1999) sugerem que sob a influência de diversos andrógenos, as células de Leydig dos juvenis de *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae) sofrem alterações em sua ultra-estrutura e tem sua atividade esteroidogênica alterada. Muitas dessas alterações estruturais também foram encontradas em *S. spilopleura*. Essas observações sugerem que a existência das populações de células de Leydig em *S. spilopleura* pode estar relacionada à expressão diferencial de receptores para os diferentes tipos de andrógenos como também pode ser um reflexo das diferentes etapas da biossíntese dos hormônios esteróides. Essas hipóteses são coerentes em um modelo de reprodução contínua, uma vez que a coexistência das diferentes etapas da espermatogênese e também do seu controle (feedback) requerem simultaneamente diferentes tipos de andrógenos.

Em *S. spilopleura*, as células de Leydig da região medular que apresentam numerosas mitocôndrias com cristas tubulares, abundante retículo endoplasmático liso com cisternas dilatadas e amplo espaço perinuclear são consideradas de intensa capacidade esteroidogênica. Essa observação está de acordo com a intensa atividade da 3β -HSD na mesma região do testículo. Em mamíferos e outros teleósteos, a síntese elevada de andrógenos também é atribuída às células de Leydig que possuem grande volume de retículo endoplasmático liso e numerosas mitocôndrias de matriz elétron-densa e cristas tubulares (Ewing & Zirkin, 1983; Yeung et al., 1985; Loir, 1990). A dilatação do espaço perinuclear é considerada como reflexo da atividade do retículo endoplasmático, isto é, sob estímulos

hormonais, o retículo endoplasmático torna-se dilatado e conseqüentemente o espaço perinuclear apresenta o mesmo comportamento, uma vez que os dois compartimentos estão conectados (ver revisão em Carvalho, 2001).

Na região cortical (armazenamento de espermatozóides), as células de Leydig de *S. spilopleura* possuem características de células em degeneração como mitocôndrias lesionadas associadas a figuras de mielina, acúmulo de vesículas elétron-densas (lisossomos e vesículas contendo enzimas hidrolíticas) e núcleo mais condensado. Essas características também ocorrem nas células de Leydig ao final do ciclo dos teleósteos de reprodução sazonal (Cauty & Loir, 1995; Cinquetti & Dramis, 2003). Em *S. spilopleura*, a intensa atividade da fosfatase ácida comprova os sinais de degeneração, e indica marcação em lisossomos, vesículas contendo enzimas hidrolíticas, mitocôndrias, autofagossomos e no núcleo. Recentemente, a presença da fosfatase ácida no núcleo tem sido reportada por vários autores (Bowen et al., 1993; Oliveira, 1997; Cruz Landim et al., 2002; Custodio et al., 2004). A atividade da fosfatase ácida no núcleo foi relacionada à transcrição de RNAr (Oliveira, 1997). No entanto, também é possível que essa atividade esteja relacionada à transcrição de RNAr para a síntese de proteínas relacionadas ao processo de morte celular (Bowen et al., 1993).

A intensa atividade fosfatásica ácida nas células de Leydig da região cortical está associada à baixa atividade da 3 β -HSD na mesma região do testículo de *S. spilopleura*. Esse dado indica envolvimento do sistema endossomo-lisossomo na degradação das enzimas esteroidogênicas, como a 3 β -HSD. Cavaco e colaboradores (1999) também documentam lisossomos e autofagossomos nas células de Leydig de *C. gariepinus* juvenis tratados com andrógenos, e os atribuem a uma remodelação citoplasmática para degradar as enzimas da via esteroidogênica (como por exemplo a 3 β -HSD) em resposta ao feedback negativo e controle da síntese de esteróides gonadais.

A associação das células de Leydig com macrófagos é evidente na região cortical do testículo de *S. spilopleura*. Em mamíferos, fatores derivados de macrófagos parecem modular a atividade esteroidogênica das células de Leydig (ver revisão em Gaytan et al., 1994). Estudos em mamíferos demonstram que citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos, inibem a síntese de andrógenos nas células de Leydig por diminuir a atividade

das enzimas da via esteroidogênica (Sun & Risbridger, 1994; Watson et al., 1994; Hales, 1996). No entanto, os macrófagos também podem estimular a proliferação e a diferenciação das células de Leydig durante o desenvolvimento testicular de roedores (Gaytan et al., 1994; Hales, 1996). Nos teleósteos, Lister e van der Kraak (2002) demonstram que o fator α de necrose tumoral (TNF α), produzido pelos macrófagos, inibe a síntese de testosterona em diversos sítios enzimáticos, e sugerem que a regulação da esteroidogênese nos peixes, à semelhança dos mamíferos, envolve múltiplos fatores que interagem de forma parácrina e autócrina no testículo. As células de Leydig com sinais de degeneração, documentadas na região cortical (espermição) do testículo de *S. spilopleura*, sugerem que, pelo menos, sob influência de hormônios e/ou citocinas, as células de Leydig passam por uma remodelação citoplasmática que envolve a ativação do sistema lisossômico para degradar as enzimas esteroidogênicas (como por exemplo a 3 β -HSD) e diminuir a síntese de esteróides. Também não é descartada a possibilidade das células de Leydig da região cortical sofrerem morte celular (não apoptótica) por autofagia. O presente trabalho também mostra que em *S. spilopleura*, a espermatogênese é um processo mais dependente de andrógenos do que a espermição.

O presente artigo descreve a ultra-estrutura das células de Leydig e a sua correlação com a atividade 3 β -HSD em um modelo de espermatogênese contínua. Documenta diferentes populações de células de Leydig na região espermatogênica (epitélio germinativo contínuo), e células de Leydig com características de degeneração na região de armazenamento de espermatozoides (epitélio germinativo descontínuo). Entretanto, os resultados geram questionamentos, como: (i) as células de Leydig com características de degeneração morrem ou apenas exibem uma remodelação citoplasmática em resposta a um feedback negativo? (ii) se as células de Leydig passam por remodelação citoplasmática, será que retomam sua habilidade de produzir andrógenos? e (iii) se as células de Leydig morrem, como ocorre sua renovação e quem seriam seus precursores? Por possuir testículo com diferentes regiões, *S. spilopleura* constitui-se um modelo interessante para responder essas questões, e em especial para melhor compreender o controle da esteroidogênese nos peixes teleósteos de água doce.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP pelas facilidades de uso e acesso; às Dras. Fabiana Laura Lo Nostro e Denise Vizziano pelas sugestões na histoquímica enzimática da 3β -HSD e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (processos 01/01575-0, 03/11078-9 e 04/01262-0).

Referências

- Bara G. (1969) Histochemical demonstration of 3β , 3α , 11β and 17β hydroxysteroid dehydrogenases in the testis of *Fundulus heteroclitus*. Gen Comp Endocrinol 13:189-200.
- Borges Filho OF. (1987) Caracterização dos estádios de maturação e correlação com avaliações histoquímico-enzimáticas e ultra-estruturais das células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo do *Prochilodus scrofa* – Steindachner, 1881. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bowen ID, Morgan SM, Mullarkey K. (1993). Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. Cell Biol. Int. Rep. 17: 13-33.
- Carvalho HF. (2001) Envoltório nuclear. In: Carvalho HF; Recco-Pimentel S, editors. A Célula 2001. Editora Manole, cap 6, p 77-87.
- Cauty C, Loir M. (1995) The interstitial cells of the trout testis (*Oncorhynchus mykiss*): ultrastructural characterization and changes throughout the reproductive cycle. Tissue Cell 27(4):383-395.
- Cavaco JEB, van Blijswijk B, Leatherland JF, Goos HJT, Schulz RW. (1999) Androgen-induced changes in Leydig cell ultrastructure and steroidogenesis in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus*. Cell Tissue Res 297:291-299.
- Cinquetti R, Dramis L. (2003) Histological, histochemical, enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* between annual breeding seasons. J Fish Biol 63:1402-1428.
- Cruz Landim C, Reginato RD, Moraes RL, Cavalcante VM. (2002) Cell nucleus activity during post-embryonic development *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Intranuclear acid phosphatase. Genet Mol Res 1(2):131-138.
- Cruz-Höfling MA, Cruz-Landim C. (1984) Ultrastructural and histochemical studies on the Leydig and Sertoli cell homologues in the testis of *Tripottheus elongatus* (Sardinhão) and *Mylossoma aureum* (Pacu). Cytobios 41:161-174.
- Cuevas ME, Collins K, Callard GV. (1993) Stage-related changes in steroid-converting enzyme activities in *Squalus* testis: synthesis of biologically active metabolites via 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase and 5α -reductase. Steroids 58:87-94.
- Custodio AM, Goes RM, Taboga SR. (2004) Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. Cell Biol Int 28(5):335-344.

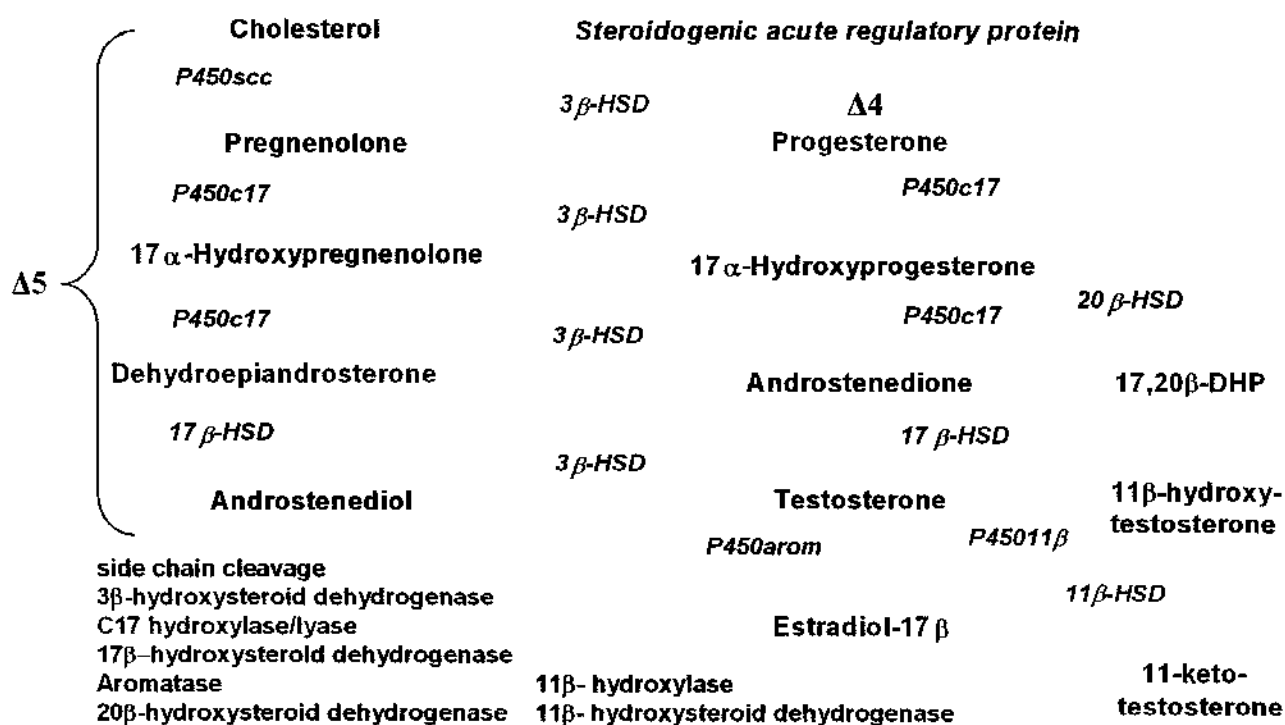
- Ewing LL, Zirkin B. (1985) Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog Horm Res* 39:599-619.
- Fujihara CY. (1997) Dinâmica populacional de *Serrasalmus spilopleura*, Kner, 1860 no reservatório de Jurumirim (rio Paranapanema, SP): aspectos do crescimento, estrutura populacional, reprodução e nutrição. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.
- García-López Á, Martínez-Rodríguez G, Sarasquete C. (2005) Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry. *Histol Histopathol* 20:1179-1189.
- Gaytan F, Bellido C, Aguilar E, van Rooijen N. (1994) Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *J Reprod Fert* 102: 393-399.
- Gazola R, Borella MI. (1997) Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Braz J Med Biol Res* 30(12) 1485-1487.
- Grier HJ, van den Hurk R, Billard R. (1989) Cytological identification of cell types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. *Cell Tissue Res* 257:491-496.
- Guraya SS. (1976) Recent advances in the morphology, histochemistry and biochemistry of steroid-synthesizing cellular sites in the testes of nonmammalian vertebrates. In *Rev Cytol* 47:99-136.
- Guraya SS. (2001) Comparative cellular and molecular biology of testis in vertebrates. Trends in endocrine, paracrine and autocrine regulation of structure and functions. Science Publishers, Inc.
- Hales DB. (1996) Leydig cell-macrophage interactions: an overview. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD, editors. *The Leydig cell*. Vienna, IL: Cache River Press. p 452-475.
- Kime DE. (1993) 'Classical' and 'non-classical' reproductive steroids in fish. *Rev Fish Biol Fish* 3:160-180.
- Kobayashi T, Chang X-T, Nakamura M, Kajiura H, Nagahama Y. (1996) Fish 3 β -hidroxy steroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase: antibody production and their use for the immunohistochemical detection of fish steroidogenic tissues. *Zool Science* 13:909-914.
- Kobayashi T, Nakamura M, Kajiura-Kobayashi H, Young G, Nagahama Y. (1998) Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3 β -HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res* 292:573-577.
- Lamas IR, Godinho AL. (1996) Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a neotropical fish with an usual pattern of sexual maturity. *Environ Biol Fishes* 45:161-168.
- Leão ELM. (1996) Reproductive biology of piranhas (Teleostei, Characiformes). In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ, editors. *Physiology and Biochemistry of fishes of the Amazon*. p 31-41.
- Lister A, van der Kraak G. (2002) Modulation of goldfish testicular testosterone production in vitro by tumor necrosis factor α , interleukin-1 β , and macrophage conditioned media. *J Exp Zool* 292:477-486.

- Lo Nostro FL, Antoneli FN, Quagio-Grassiotto I, Guerrero GA. (2004) Testicular interstitial cells, and steroidogenic detection in the protogynous fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). *Tissue Cell* 36:221-231.
- Loir M, Margeridon A, Cauty C. (1989) Leydig cells in *Myleus ternetzi* testes. *Aquat Living Resour* 2:57-61.
- Loir M. (1990a) Trout steroidogenic testicular cells in primary culture. II Steroidogenic activity of interstitial cells, Sertoli cells, and spermatozoa. *Gen Comp Endocrinol* 78:388-398.
- Loir M. (1990b) Interstitial cells from the testis of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vivo and in primary culture. *Cell Tissue Res* 261:133-144.
- Loir M. (1999) Spermatogonia of rainbow trout. II In vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol Reprod Develop* 53:434-442.
- Marshall AJ, Lofts B. (1956) The Leydig-cell homologue in certain teleost fishes. *Nature* 177:704-705.
- Miura T, Miura CI. (2003) Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol Biochem* 28:181-186.
- Oliveira APML. (1997) Estudo citoquímico em glândulas salivares de triatomídeos do gênero *Rhodnius*. Dissertação de Mestrado, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.
- Pudney J. (1996) Comparative cytology of the Leydig cell. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD, editors. *The Leydig cell*. Vienna, IL: Cache River Press. p 98-142.
- Pudney J. (1999) Leydig and Sertoli cells, nonmammalian. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 2. San Diego, CA: Academic Press. p 1008-1020.
- Roberts SB, Jackson LF, King W, Taylor RG, Grier HJ, Sullivan CV. (1999) Annual reproductive cycle of the common snook: endocrine correlates of maturation. *Trans Amer Fish Soc* 128:436-445.
- Schleser DM. (1997) Piranhas: everything about origins, care, feeding, diseases, breeding, and behavior. *Barron's Educational Series, Inc.* New York 88 pp.
- Scott AP, Sumpter JP. (1989) Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentration of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. *Gen Comp Endocrinol* 73:46-58.
- Shanbhag AB, Nadkarni, VB. (1979) Histological and histochemical studies on the testicular cycle of a fresh water teleost *Channa gachua* (Hamilton). *Anat Anz* 146:381-389.
- Silva M. (1987) Morfologia ultra-estrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemo-testicular da tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Peixe, Ciclideo). Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- Sun XR, Risbridger GP. (1994) Site of macrophage inhibition of luteinizing hormone-stimulated testosterone production by purified Leydig cells. *Biol Reprod* 50:363-367.
- Tähkä KM. (1988) Effect of differential photoperiod treatment on Leydig cell ultrastructure in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*, S). *Gen Comp Endocrinol* 71:318-330.
- Teles MEO, Godinho HP. (1997) Ciclo reprodutivo da pirambeca *Serrasalmus brandtii* (Teleostei, Characidae) na Represa de Três Marias, Rio São Francisco. *Rev Brasil Biol* 57:177-184.

- Van den Hurk R, Peute J, Vermeij JAJ. (1978) Morphological and enzyme cytochemical aspects of the testis and vas deferens of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Cell Tissue Res 186:309-325.
- Van Vuren JHJ, Soley JT. (1990) Some ultrastructural observations of Leydig and Sertoli cells in the testis of *Tilapia rendalli* following induced testicular recrudescence. J Morphol 206:57-63.
- Watson ME, Newman RJ, Payne AM, Abdelrahim M, Francis GL. (1994) The effect of macrophage conditioned media on Leydig cell function. Ann Clin Lab Sci 24:84-95.
- Wiebe JP. (1969) Steroid dehydrogenases and steroids in the gonads of the seaperch *Cymatogaster aggregata* Bibbons. Gen Comp Endocrinol 12:256-266.
- Yaron Z. (1966) Demonstration of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the testis of *Tilapia mossambica* (Cichlidae, Teleostei). J Endocrin 34:127-128.
- Yeung WSB, Adal MN, Hui SWB, Chan STH. (1985) The ultrastructural and biosynthetic characteristics of steroidogenic cells in the gonad of *Monopterus albus* (Teleostei) during natural sex reversal. Cell Tissue Res 239:383-394.

Legenda das Figuras

Figura 1. Biossíntese dos hormônios esteróides nos peixes.



LOCALIZAÇÃO DAS ENZIMAS:

P450_{scc} = enzima mitocondrial

3 β -HSD
17 β -HSD
P450_{17 α}
 e as demais

enzimas do retículo endoplasmático liso

Figura 2. Mecanismo de ação da 3 β -HSD.

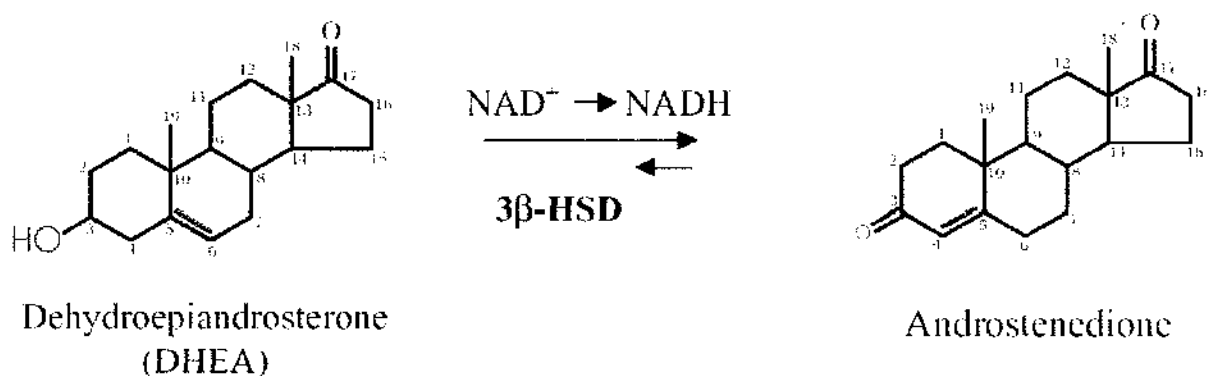


Figura 3. Histoquímica enzimática para 3 β -HSD nos testículos de *S. spilopleura*. a-d: Região medular do testículo. Notar intensa reação para 3 β -HSD no compartimento intersticial, em particular, no citoplasma das células de Leydig. Marcações também foram encontradas nas bordas dos cistos e ao redor das células germinativas. **c:** Os quadrados delimitam grupos de células de Leydig. **e,f:** Região cortical do testículo. Notar fraca e dispersa reação da 3 β -HSD no compartimento intersticial. *Le* = células de Leydig, *gc* = compartimento germinativo, *ic* = compartimento intersticial, *ge* = epitélio germinativo, *cy* = cisto, *cabeça de seta* = marcação na borda dos cistos e ao redor das células germinativas, *n* = núcleo. *Barras* = **a,e** 100 μ m; **b** 50 μ m; **c-d,f** 10 μ m.

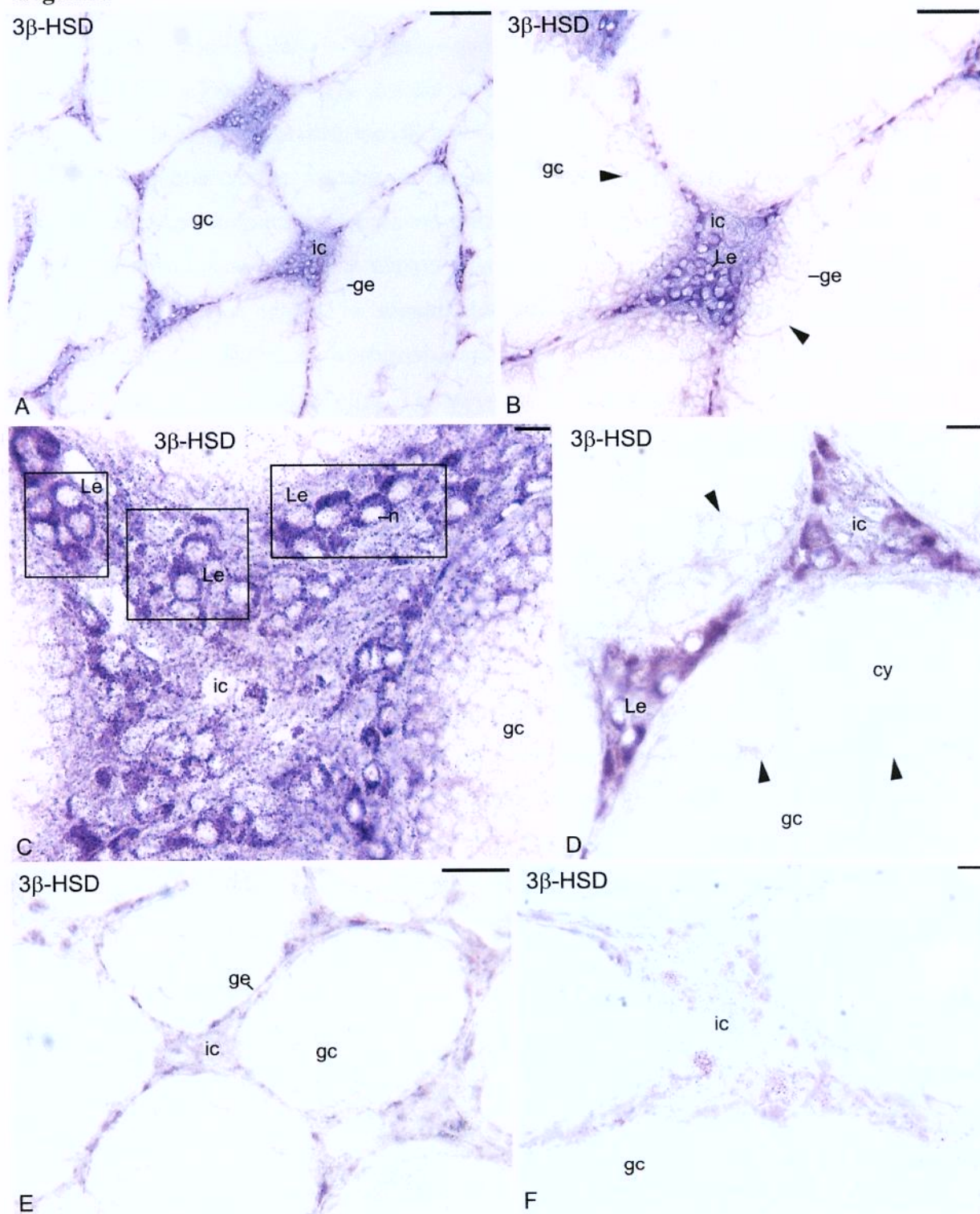
Figura 3**3 β -HSD**

Figura 4. Ultra-estrutura das células de Leydig na região medular do testículo de *S. spilopleura*. a-l: *LE* = célula de Leydig, *C* = colágeno, *IC* = compartimento intersticial, *TC* = cristas tubulares, *M* = mitocôndrias, *N* = núcleo, *NU* = nucléolo, *SER* = retículo endoplasmático liso, *BV* = vaso sanguíneo. **a:** *LE com estrela* = célula de Leydig com retículo endoplasmático liso dilatado. **b:** *cabeças de setas* = retículo endoplasmático liso com cisternas dilatadas, *seta larga* = aumento do espaço perinuclear. **c:** *setas largas* = mitocôndrias com elétron-densidade moderada, *estrela* = retículo endoplasmático liso. **d:** Notar mitocôndrias (*M*) com elétron-densidade intensa. **e:** Detalhe do citoplasma da célula de Leydig. *estrelas* = mitocôndrias com elétron-densidade moderada, *cabeças de setas* = granulações na matriz mitocondrial. **f:** *asteriscos* = mitocôndrias com cristas tubulares, *setas* = retículo endoplasmático liso ao redor das mitocôndrias. **g:** *LE com estrela* = célula de Leydig com retículo endoplasmático liso dilatado. **h:** *setas brancas* = mitocôndrias grandes com cristas tubulares, *asterisco* = retículo endoplasmático liso abundante. **i:** Aumento da região delimitada em h. *asteriscos brancos* = mitocôndrias grandes, elétrondensas e com cristas tubulares (*TC*). **j,k:** Células de Leydig com retículo endoplasmático dilatado (*LE com estrela*). *asteriscos* = numerosas mitocôndrias, *cabeças de setas* = cisternas dilatadas do retículo endoplasmático liso, *setas pequenas brancas* = mitocôndrias de outra célula de Leydig. Em consequência da dilatação do retículo endoplasmático liso, o espaço perinuclear também fica expandido (*seta*). **l:** *estrelas sem preenchimento* = mitocôndrias numerosas e elétrondensas, *NA* = nervo amielínico, *SCH* = célula Schwann, *seta larga* = granulócito, *asteriscos brancos* = grânulos. Barras = **a** 3 μm ; **b** 1,5 μm ; **c** 1,4 μm ; **d** 1 μm ; **e** 0,5 μm ; **f** 2,3 μm ; **g** 2,5 μm ; **h** 1,2 μm ; **i** 0,5 μm ; **j** 1,8 μm ; **k** 1 μm ; **l** 1,6 μm .

Figura 4

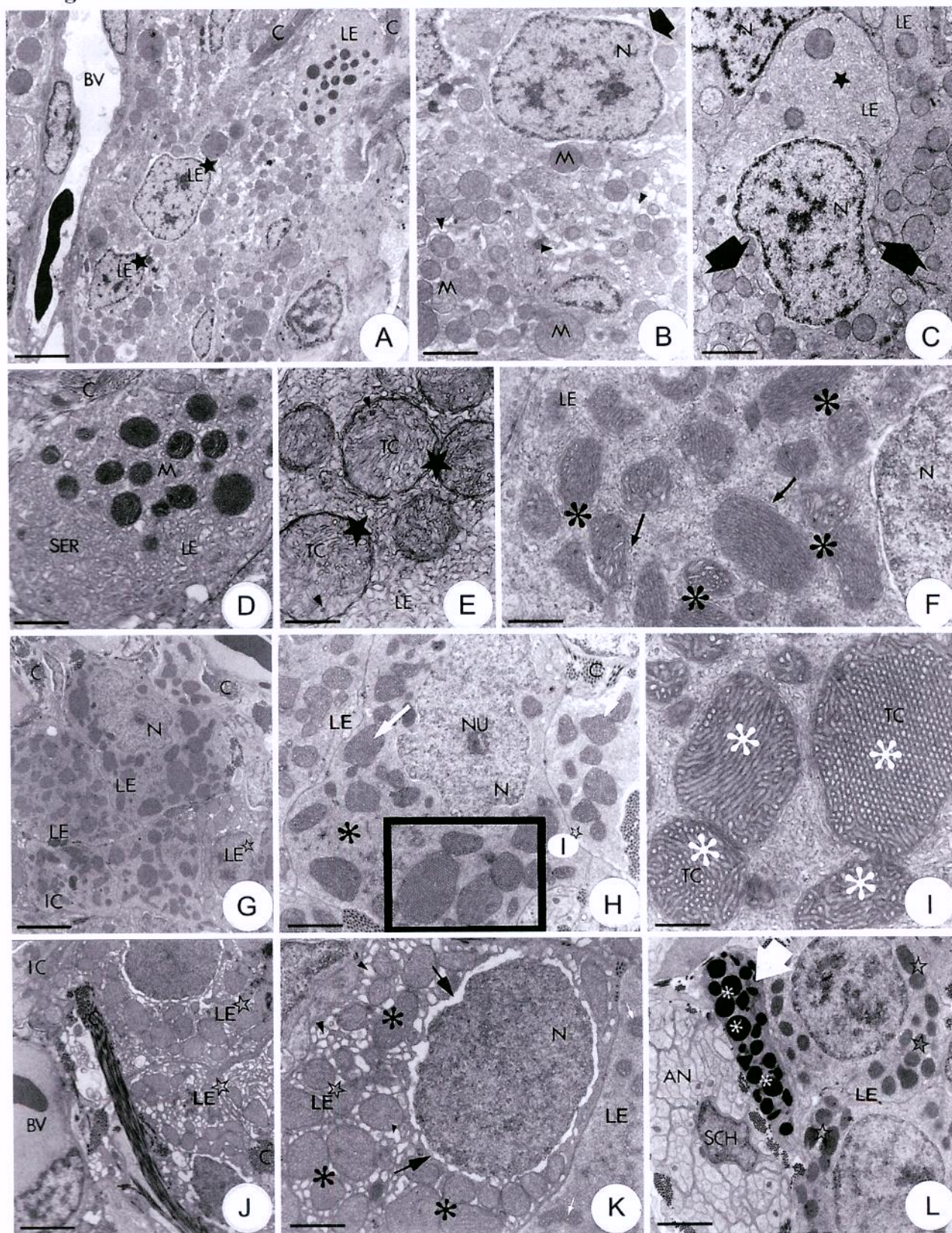


Figura 5. Ultra-estrutura das células de Leydig na região cortical do testículo de *S. spilopleura*. **a-j** *CA* = capilar sanguíneo, *LE* = células de Leydig, *SE* = célula de Sertoli, *MY* = célula mióide, *C* = colágeno, *GC* = compartimento germinativo, *IC* = compartimento intersticial, *GE* = epitélio germinativo, *SGA* = espermatogônias do tipo A, *SZ* = espermatozóides, *SP* = espermição, *ER* = hemácias, *L* = lúmen testicular, *BV* = vaso sanguíneo. **a:** *asterisco* = inclusões de lipídios. **b:** *DE* = epitélio germinativo descontínuo, *seta grande* = fagossomos, *asteriscos* = vacúolos digestivos, *cabeça de seta* = dilatação do espaço perinuclear, *estrelas* = mitocôndrias sem lesão, *setas pequenas* = mitocôndrias grandes. **c:** *DGE* = epitélio germinativo descontínuo, *setas largas* = inclusões de lipídios nas SE, *cabeça de seta* = células mióides, *LE com estrela* = células de Leydig com retículo endoplasmático liso dilatado. **d:** Aumento da região delimitada em b. Detalhe de uma célula de Leydig com sinais de degeneração: mitocôndrias grandes (*estrelas*) e figura de mielina associada (*seta*). Notar expansão do espaço perinuclear (*cabeça de seta*). **e:** *asteriscos* = células de Leydig com sinais de degeneração, *seta larga* = macrófago. **f:** *I* = interstício, *setas largas* = macrófagos, *estrela* = restos celulares. **g:** Setas largas mostram interação entre célula de Leydig (LE) e macrófago (M). *estrelas* = acúmulo de vesículas, *estrela com cabeça de seta* = mitocôndria lesionada. **h-j:** *I* = interstício, *estrelas* = acúmulo de vesículas de formatos e elétrons-densidades diferentes, *SG* = espermatogônias. Células de Leydig em degeneração (*LE com estrela* - observar mitocôndrias em degeneração ou aumento de vesículas contendo enzimas hidrolíticas). *N* = nervo misto, isto é, amielínico e mielínico. *Barras* = **a** 5,5 µm; **b** 4,1 µm; **c** 5 µm; **d** 5 µm; **e** 4 µm; **f** 5 µm; **g** 2 µm; **h** 4 µm; **i** 2 µm; **j** 5 µm.

Figura 5

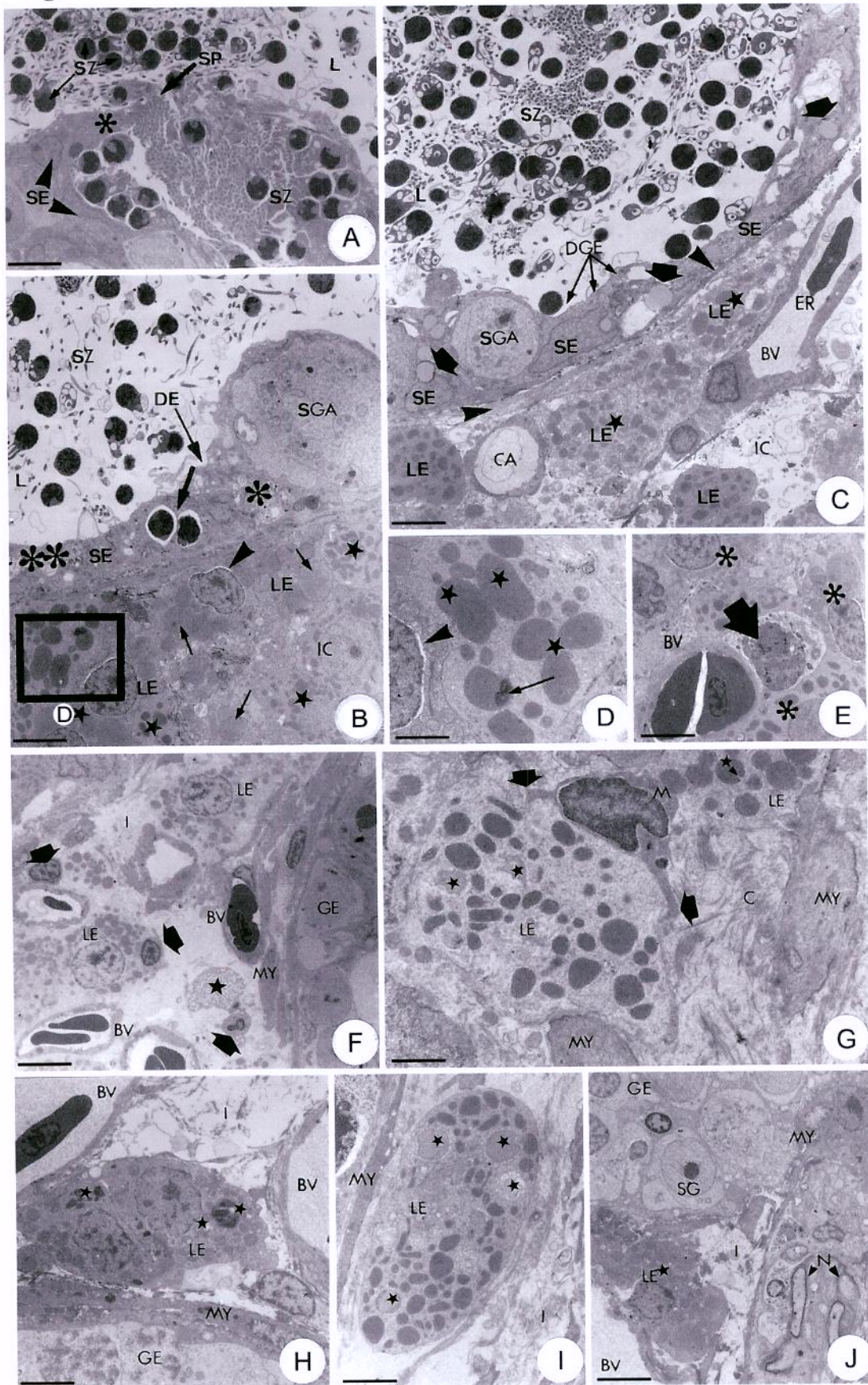
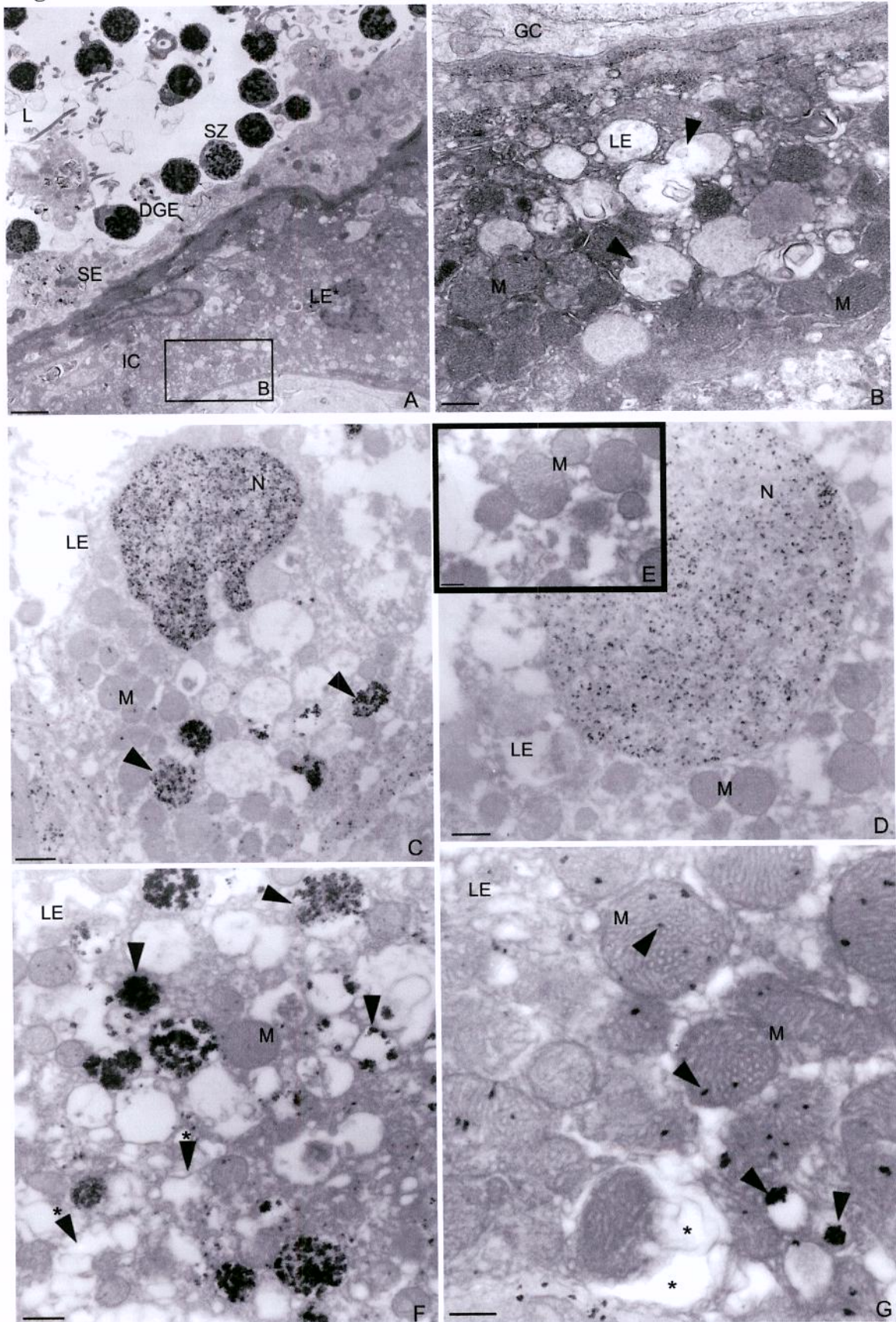


Figura 6. Ultra-estrutura das células de Leydig na região cortical do testículo de *S. spilopleura* e citoquímica ultra-estrutural para fosfatase ácida. a-g: *LE* = células de Leydig, *SE* = célula de Sertoli, *GC* = compartimento germinativo, *IC* = compartimento intersticial, *DGE* = epitélio germinativo descontínuo, *SZ* = espermatozóides, *L* = lúmen testicular, *M* = mitocôndrias, *N* = núcleo. **a:** *LE com asterisco* = célula de Leydig com sinais de degeneração. Notar núcleo mais condensado e intensa vacuolização citoplasmática. **b:** Detalhe da região delimitada em a. Notar intensa vacuolização (*cabeças de setas*). **c-g:** Fosfatase ácida. **e,d:** Controle negativo da reação. **c:** *Cabeças de setas* = mostram marcação enzimática no interior de vesículas (lisossomos). **f:** *Cabeças de setas* = mostram marcação enzimática no interior de vesículas; vesículas grandes são consideradas lisossomos enquanto que as menores são tidas como vesículas provenientes do complexo de Golgi. *Asteriscos com cabeças de setas* indicam a fusão do sistema de endomembranas e incorporação de mitocôndrias. Notar que algumas vesículas com marcação enzimática se fusionam a compartimentos delimitados por membrana contendo mitocôndrias. **g:** *cabeças de setas* = marcação enzimática no interior de mitocôndrias e em vesículas pequenas, *asteriscos* = fusão do sistema de endomembranas e incorporação de mitocôndrias. Barras = **a** 2 μm ; **b** 0,4 μm ; **c** 0,8 μm ; **d** 0,4 μm ; **e** 0,2 μm ; **f** 0,4 μm ; **g** 0,2 μm .

Figura 6



CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS DO EPITÉLIO GERMINATIVO, PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI E ATIVIDADE 3 β -HSD DURANTE A ESPERMATOGÊNESE DESCONTÍNUA DE *PIMELODUS MACULATUS* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE).

Resumo

Os testículos de *Pimelodus maculatus* estão divididos em franjas espermatogênicas, intermediárias e de secreção. A reprodução de *P. maculatus* é sazonal, isto é, os testículos passam progressivamente por modificações morfológicas e apresentam espermatozóides somente em uma determinada etapa do ciclo reprodutivo. Cada etapa do desenvolvimento testicular é caracterizada por uma forma de epitélio germinativo (contínuo ou sazonal) e por um tipo específico de célula germinativa. As alterações morfológicas e morfométricas do epitélio germinativo permitem descrever 4 classes reprodutivas: regredida, maturação, maturação final e regressão. Na classe regredida, o epitélio germinativo é contínuo e formado apenas por espermatogônias. A maturação é caracterizada por predominância de epitélio germinativo contínuo, constituído por cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides. A maturação final exhibe epitélio totalmente descontínuo, e lúmen testicular amplo e repleto de espermatozóides. A regressão envolve a liberação dos espermatozóides e o preparo da gônada para o próximo ciclo. Apresenta epitélio germinativo descontínuo que é gradativamente repovoado por espermatogônias. Apesar da grande quantidade de espermatogônias, a proliferação espermatogonial é baixa durante a classe regredida e atribuída à divisão das espermatogônias tronco. A atividade proliferativa das espermatogônias é intensa na maturação e depois diminui, coincidindo com a exaustão das espermatogônias e conseqüentemente com a formação do epitélio germinativo descontínuo. A proliferação das células de Sertoli ocorre em maior frequência na classe regredida, e contribui para o crescimento do testículo durante o ciclo reprodutivo. Células intersticiais

com formato fusiforme também se dividem na classe regredida e são consideradas como precursoras das células de Leydig. A atividade 3β -HSD é maior na maturação e depois diminui na regressão e na classe regredida.

Introdução

A despeito das diferentes estratégias reprodutivas e da conseqüente diversidade de morfologias gonadais, o testículo dos peixes teleósteos é caracterizado em dois tipos (tubular anastomosado e lobular), conforme a organização do compartimento germinativo na periferia testicular (Grier, 1993; Grier & Taylor, 1998; Parenti & Grier, 2004). No testículo tubular anastomosado, o compartimento germinativo forma uma rede altamente ramificada de alças e túbulos que se interconectam por toda extensão testicular (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004). O testículo lobular é caracterizado por apresentar compartimento germinativo em formato digitiforme (com fundo cego) na periferia ventro-lateral do órgão (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004).

A superordem Ostariophysi, série Otophysi, compreende as ordens Siluriformes (15 famílias e aproximadamente 37% das espécies) e Characiformes (14 famílias e aproximadamente 33% das espécies) e a ordem Gymnotiformes (cinco famílias e aproximadamente 3% das espécies) (Reis et al., 2003). Dentre os Ostariophysi, os Siluriformes são considerados uma das ordens mais diversas e abundantes da fauna Neotropical (Fink & Fink, 1981; Loir et al., 1989; Nelson, 1994; Reis et al., 2003). A ordem Siluriformes compreende um grupo de peixes extremamente grande, diverso e amplamente distribuído nas regiões tropicais de todo o mundo (Fink & Fink, 1981; Loir et al., 1989; Nelson, 1994; Reis et al., 2003). Essa diversidade reflete-se na morfologia gonadal, em especial no sistema reprodutor masculino (Loir et al., 1989). Nos Siluriformes, o conhecimento da estrutura testicular e da anatomia das diferentes porções do testículo além de fornecer subsídios para a melhor compreensão do padrão de evolução gonadal do grupo, compõe um conjunto de dados morfológicos, que juntamente com os dados morfológicos tradicionais (osteológicos e de partes moles), e os dados moleculares, podem ser utilizados no estudo das relações filogenéticas entre as famílias.

Recentemente, o epitélio germinativo dos peixes foi redefinido e, readequado de acordo com os critérios histológicos de um tecido epitelial (Grier, 2000; Grier & Lo Nostro, 2000; Grier, 2002). Nos machos dos teleósteos, o epitélio germinativo é formado por cistos, os quais são constituídos por células germinativas, em desenvolvimento parcialmente sincrônico, envoltas pelos processos citoplasmáticos das células de Sertoli (Pudney, 1995; Callard & Callard, 1999; Schulz & Miura, 2002; Miura & Miura, 2003; Schulz, 2003). A espermatogênese ocorre no interior dos cistos e durante suas principais fases (proliferação espermatogonial, meiose dos espermatócitos, espermiogênese e espermição) (Schulz & Miura, 2002; Miura & Miura, 2003; Schulz, 2003), as células germinativas e as células de Sertoli passam por alterações morfológicas que refletem o estado e a funcionalidade do epitélio germinativo (contínuo e descontínuo) (Grier & Taylor, 1998; Grier, 2000; Grier & Lo Nostro, 2000; Grier, 2002). O epitélio germinativo contínuo é formado por cistos que estão dispostos ao longo de toda a membrana basal (Grier & Taylor, 1998; Grier, 2000; Grier, 2002; Lo Nostro et al., 2003). Trata-se de um epitélio ativo, com constante produção de células germinativas (Grier & Taylor, 1998). O epitélio germinativo descontínuo é resultado da espermição (liberação dos espermatozóides para o lúmen testicular) e da não reposição de imediato das células germinativas, o que gera regiões de células de Sertoli entremeadas a poucos e dispersos cistos de espermatogônias (Grier & Taylor, 1998; Grier, 2000; Grier, 2002; Lo Nostro et al., 2003). Funcionalmente, trata-se de um epitélio que deixa de produzir células germinativas e assume função de armazenamento de espermatozóides (Grier & Taylor, 1998).

Nos teleósteos adultos, a proliferação das células de Sertoli tem sido descrita por vários pesquisadores (Billard, 1969; Grier, 1993; Koulish et al., 2002; Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2003; Lo Nostro et al., 2003; Chaves-Pozo et al., 2005; Schulz et al., 2005) e fornecido subsídios para compreender as sucessivas gerações de células de Sertoli a cada período reprodutivo (Koulish et al., 2002; Lo Nostro et al., 2003), o crescimento testicular (Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005) e para aumentar a produção espermática final das espécies (Matta et al., 2002). Na maioria das espécies estudadas, as células de Sertoli proliferam em associação aos cistos de espermatogônias, porém, também podem se dividir em cistos de espermatócitos e espermátides (Billard, 1969; Koulish et al., 2002; Vilela et

al., 2003; Shulz et al., 2005). Com exceção do bagre africano, *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae) (Schulz et al., 2003; Shulz et al., 2005), não existem informações sobre a proliferação das células de Sertoli em teleósteos mais primitivos de estrutura testicular tubular anastomosado.

P. maculatus (Lacépède, 1803) pertence à ordem Siluriformes e à família Pimelodidae, considerada uma das famílias mais abundantes e diversas dentre os peixes de couro. É uma espécie de ampla distribuição, sendo encontrada em várias bacias hidrográficas da América do Sul (Godoy, 1987; Bazzoli et al., 1997). Sua reprodução é sazonal com desova parcelada no período de outubro a janeiro (Godinho et al., 1974, 1977; Fenerish, 1975), podendo ser antecipada ou atrasada, uma vez que está na dependência de uma série de fatores como cheias prolongadas, temperatura elevada e permanente, e turbidez pequena (Azevedo, 1972).

Durante os últimos cinquenta anos, o ciclo reprodutivo dos peixes teleósteos tem sido documentado através de parâmetros como índice gonadossomático, volume gonadal, anatomia e histologia das gônadas. Apesar das variáveis supracitadas e das descrições existentes serem úteis para determinar o período reprodutivo, algumas questões, como os mecanismos de crescimento gonadal, regressão, renovação celular a cada ciclo reprodutivo e as alterações das células esteroideogênicas testiculares precisam ainda ser melhor exploradas.

Sendo assim, elegendo *P. maculatus* como modelo experimental, os propósitos do presente trabalho são: (1) descrever a anatomia das diferentes porções do testículo; (2) analisar a estrutura testicular conforme a organização do compartimento germinativo; (3) descrever o ciclo reprodutivo de *P. maculatus* através das alterações morfológicas e morfométricas do epitélio germinativo; (4) documentar e quantificar, através do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), o número médio de células em proliferação (espermatogônias, células de Sertoli e células intersticiais) durante cada etapa do ciclo; (5) detectar por histoquímica enzimática (3 β -HSD) as células esteroideogênicas testiculares e analisar seu comportamento durante o ciclo reprodutivo.

Material e Métodos

Os animais

Machos adultos de *P. maculatus* foram coletados, mensalmente, no rio Piracicaba (Município de Santa Maria da Serra, Estado de São Paulo, Brasil), durante o período de fevereiro de 2004 a abril de 2005, somando ao todo 80 exemplares. Os animais foram anestesiados com 0,1% de benzocaina, pesados e seus comprimentos mensurados. Em seguida, os animais foram sacrificados por decapitação e seus testículos rapidamente removidos, pesados e imersos em solução fixadora apropriada para cada metodologia. Animais na mesma faixa de comprimento foram considerados para o cálculo do índice gonadosomático ($IGS = [\text{peso das gônadas} / \text{peso total do animal}] \times 100$). Após observação histológica, os valores do IGS de cada classe reprodutiva foram agrupados e tratados estatisticamente através do programa GraphPad Instat (3.06) por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. A frequência de cada classe reprodutiva também foi estimada durante o período de estudo. Os procedimentos adotados estão de acordo com o Comitê de Ética Animal e IBAMA.

Histologia

Os testículos de *P. maculatus* foram fixados em solução de 2% glutaraldeído e 4% paraformaldeído, em tampão fosfato Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. O material foi desidratado, infiltrado e incluído em resina Technovit 7100 (Jung HistoResin). Cortes transversais, longitudinais e seriados das porções cranial, mediana e caudal do testículo foram obtidos com 3µm de espessura e corados em Hematoxilina Férrica/Eosina e PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow (Quintero-Hunter et al., 1991). A anatomia testicular foi fotografada e as secções histológicas analisadas e documentadas através de sistema computadorizado para análise de imagens (Leica Qwin 2.5).

Análise estereológica

A proporção dos componentes testiculares durante o ciclo reprodutivo foi realizada através da contagem de pontos sobre campos histológicos de acordo com metodologia proposta por Weibel (1978). A porcentagem de cada componente foi determinada pela fórmula: [número de pontos sobre um determinado componente testicular/número total de

pontos sobre o campo histológico]x 100. Conforme padronização preliminar, foram utilizados 5 animais por classe reprodutiva, sendo que para cada exemplar foram quantificados aleatoriamente 5 campos histológicos distintos de 3µm de espessura. Os componentes testiculares foram contados em objetiva de imersão com retículo de 130 pontos (13x10). Ao todo foram contados 650 pontos por animal e 3.250 pontos por classe reprodutiva. No compartimento germinativo, as estruturas quantificadas foram: espermatogônias (primárias e secundárias); espermátócitos (primários e secundários); espermátides; espermatozóides (sempre na luz do compartimento germinativo); células de Sertoli e luz do compartimento germinativo. No compartimento intersticial, granulócitos e componentes intersticiais (células de Leydig, células mióides, vasos sanguíneos e outros) também foram quantificados. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente através do programa GraphPad InStat (3.06) por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey.

PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

O PCNA é altamente conservado (ver Chieffi et al., 2001) e considerado o marcador mais utilizado para se detectar proliferação celular nos testículos dos vertebrados: em peixes - *Anguilla japonica* (Miura et al., 1999; Miura et al., 2002), *S. marmoratus* (Lo Nostro et al., 2003); em anfíbios - *Cynops pyrrhogaster* (salamandras) (Yazawa et al., 2000); em répteis - *Podarcis s. sicula* (lagartixas) (Chieffi et al., 2001); e em mamíferos (Kang et al., 1997). Fragmentos de testículos de *P. maculatus* foram fixados, processados em parafina, seccionados, desparafinizados e preparados para reação imuno-histoquímica do PCNA conforme as especificações do fabricante (Novocastra – NCL-PCNA). Como controle negativo, algumas lâminas tiveram o anticorpo primário omitido e substituído por TBS.

Estimativa do número médio de células em proliferação

O número médio de células em proliferação foi estimado através da contagem de células imunoreativas ao PCNA por campo histológico, semelhante à metodologia de Chaves-Pozo e colaboradores (2005). Para tanto, foram utilizados 5 animais por classe

reprodutiva, sendo que para cada exemplar foram contados aleatoriamente 5 campos histológicos distintos (cada campo tem 17mm² de área) em objetiva de imersão, totalizando 25 campos para cada classe reprodutiva. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente através do programa GraphPad InStat (3.06) por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey.

Histoquímica enzimática da 3 β -HSD

Fragmentos de testículos de *P. maculatus*, provenientes de diferentes classes reprodutivas, foram criopreservados com soluções crescentes de sacarose, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e acondicionados em freezer (-80°C) até o momento da reação. O material congelado foi seccionado em criostato (5 μ m de espessura) e incubado por 2h (37°C) em meio contendo: 11,9 ml de tampão fosfato (pH 7,6); 900 μ l de nitro blue tetrazolium (NBT) (preparado com 1,0mg dissolvido em 1 ml de água destilada); 600 μ l de substrato (preparado com 4mg de dehidroepiandrosterona dissolvidos em 1ml de dimetilsulfóxido - DMSO) e 20,0mg de NAD⁺. Após incubação, o material foi lavado em tampão fosfato, fixado em formol Ca⁺² e montado em gelatina. Como controle negativo, algumas lâminas foram incubadas em (1) meio sem esteróide ou em (2) meio sem NAD⁺.

Resultados

Anatomia e Estrutura Testicular

Os testículos de *P. maculatus* são pares e formados por franjas de formato e número variável (Fig. 1A-D). As franjas conectam-se cranialmente ao ducto testicular principal (Fig. 1A-D) e caudalmente a um ducto comum, denominado de ducto espermático (Fig. 1A-D). O ducto espermático é formado pela fusão lateral do ducto principal de cada testículo (Fig. 1B) e exterioriza-se através da papila urogenital. De acordo com os tipos de franjas, os testículos de *P. maculatus* estão divididos em 3 regiões: (1) cranial com franjas exclusivamente espermatogênicas; (2) intermediária ou de transição, constituída por franjas intermediárias; e (3) caudal, formada apenas por franjas secretoras (Fig. 1A,B).

As franjas espermatogênicas ocupam grande parte da porção cranial dos testículos de *P. maculatus* (Fig. 1A-D). São numerosas, com formato variável (Fig. 1A-D) e

apresentam-se divididas em dois compartimentos; o germinativo e o intersticial separados por uma membrana basal (Fig. 1E). O compartimento germinativo disposto na forma de alças e túbulos é revestido pelo epitélio germinativo (Fig. 1E). Trata-se de uma estrutura do tipo tubular anastomosado, como demonstrado na Figura 1E. O compartimento intersticial é formado por um tecido conjuntivo frouxo, que é uma extensão do tecido conjuntivo subjacente à cápsula testicular (Fig. 1E).

As franjas intermediárias ou de transição distribuem-se na região intermediária do testículo entre as franjas espermatogênicas e as franjas secretoras (Fig. 1A,B). De difícil distinção anatômica (Fig. 1C,D), as franjas intermediárias são dotadas de intensa musculatura lisa e epitélio simples cúbico que se organiza em túbulos e alças (Fig. 1F,I). Próximo ao ducto espermático, as franjas intermediárias possuem luz repleta de espermatozóides, enquanto que na região oposta (distal), a luz encontra-se parcialmente obliterada e sem nenhuma secreção (Fig. 1F). As características supracitadas sugerem um papel de armazenamento de espermatozóides nas franjas intermediárias (Fig. 1F).

As franjas secretoras ocorrem na região caudal do testículo e têm aspecto mais esbranquiçado do que os outros tipos de franjas (Fig. 1A,B,C). Apresentam epitélio em diferentes etapas da biossíntese e acúmulo de secreção (Fig. 1G,H). Inicialmente, o epitélio secretor é simples cilíndrico e a secreção é liberada de forma apócrina (parte do citoplasma desprende-se do epitélio) (Fig. 1G,J). Progressivamente, o epitélio torna-se simples cúbico e a secreção é constituída por granulações heterogêneas (Fig. 1G,K). Ao final do processo, o epitélio secretor é simples pavimentoso e a secreção é mais abundante, homogênea e finamente granular (Fig. 1H,L). A secreção é acidófila (Fig. 1K,L) e não reage ao PAS (Fig. 1G,H,J), o que indica, respectivamente, caráter básico e ausência de polissacarídeos neutros em sua composição. Alguns poucos espermatozóides podem ser encontrados no interior das franjas secretoras (Fig. 1G,H,J-L).

As características anatômicas do testículo de *P. maculatus* alteram-se significativamente durante o ciclo reprodutivo (Fig. 1A,B,C,D). Nos testículos regredidos (início do ciclo reprodutivo), as franjas espermatogênicas são estreitas e afiladas, enquanto que as caudais, também afiladas, não apresentam nenhum tipo de secreção (Fig. 1C). Durante a maturação, os testículos possuem franjas caudais pouco desenvolvidas e em

processo de formação de secreção (Fig. 1B). Na maturação final, os testículos são bem desenvolvidos; com franjas espermatogênicas e intermediárias repletas de espermatozóides (Fig. 1E,F) e franjas caudais com grande quantidade de secreção (Fig. 1H). Na regressão, os testículos têm anatomia semelhante à dos testículos regredidos (Fig. 1D), com exceção das franjas caudais que ainda possuem alguma secreção.

Ciclo Reprodutivo – Alterações no epitélio germinativo

As alterações histológicas e morfométricas do epitélio germinativo permitem descrever 4 classes reprodutivas ao longo do ciclo de *P. maculatus*: regredida; maturação; maturação final; e regressão. Variações no IGS também acompanham as alterações do epitélio germinativo em cada classe reprodutiva (Gráfico 1). A dinâmica da reprodução de *P. maculatus* pode ser observada pela distribuição das classes reprodutivas durante o período de estudo (Gráfico 2). O período reprodutivo de *P. maculatus* é longo e concentra-se principalmente entre os meses de dezembro a julho (Gráfico 2).

Classe Regredida

Na classe regredida, os testículos de *P. maculatus* apresentam franjas reduzidas, com compartimento germinativo na forma de túbulos anastomosados (Fig. 2A,B). O compartimento germinativo é constituído apenas por espermatogônias e células de Sertoli (Fig. 2C-G) (Gráfico 4). Possui luz obliterada, embora, possa conter espermatozóides residuais (Fig. 2F,G) (Gráfico 4). O compartimento germinativo é separado do tecido intersticial através de uma membrana basal nítida ao PAS (Fig. 2C-G). O interstício é proeminente (Gráficos 3 e 7) e com intensa vascularização (Fig. 2C,H-J). As células de Leydig são encontradas próximas a vasos sanguíneos (Fig. 2C), em especial, aos vasos da cápsula testicular (Fig. 2H-J). Uma grande quantidade de granulócitos também é notada no interstício dessa classe reprodutiva (Fig. 2C,H-J) (Gráfico 7). Muitos granulócitos estão associados a grupos de células de Leydig (Fig. 2H-J).

A proliferação espermatogonial é evidenciada através de figuras mitóticas (Fig. 2D-inset) e também pela imuno-histoquímica do PCNA (Fig. 10). As espermatogônias apresentam marcação nuclear para o PCNA e sua atividade proliferativa é considerada

baixa em relação às demais classes reprodutivas (Gráfico 5). As células de Sertoli também têm reação ao PCNA (Fig. 10) (Gráficos 5 e 6). A divisão desse tipo celular, em sua maior parte, ocorre quando as células de Sertoli estão associadas a espermatogônias não marcadas ao PCNA, ou seja, associadas a espermatogônias que não estão em proliferação (Fig. 10D,E). A proliferação das células de Sertoli é intensa (Gráficos 5 e 6), e resulta em um número elevado de células de Sertoli por espermatogônia (Fig. 2C,E-inset). Células intersticiais de formato fusiforme também são imunoreativas ao PCNA (Fig. 10C,F). A proliferação das células intersticiais também foi documentada junto da região da cápsula testicular (Fig. 10F). O número médio de células intersticiais em proliferação é elevado nesta etapa reprodutiva (Gráfico 5).

A localização da 3 β -HSD concentra-se ao redor das espermatogônias (Fig. 14A,B). Não foram detectadas atividades de 3 β -HSD no interstício (Fig. 14A,B).

Classe de Maturação

A maturação caracteriza-se pelo início da espermatogênese. O epitélio germinativo é constituído por cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides (Fig. 5) (Gráfico 4). Em *P. maculatus*, a maturação apresenta predominância de epitélio germinativo contínuo na porção distal das franjas; e epitélio germinativo descontínuo na porção proximal (próxima à região do ducto testicular principal) (Fig.3). No entanto, em etapas mais avançadas da maturação, a situação inverte-se: epitélio descontínuo e repleto de espermatozóides na porção distal; e epitélio contínuo na região próxima ao ducto testicular principal (Fig. 4). Essas observações indicam que a espermatogênese ocorre mais de uma vez em cada porção da franja. Franjas em diferentes etapas de maturação também são documentadas em *P. maculatus* (Fig. 3A).

A ocorrência de sucessivos ciclos espermatogênicos em cada porção da franja é atribuída à cinética do epitélio germinativo (Fig. 5); em especial ao rápido *turnover* das espermatogônias. As espermatogônias basais do epitélio proliferam e chegam a formar uma camada contínua abaixo do estrato que está em maturação (Fig. 5B,C,E). Quando os cistos do estrato superior sofrem espermição, o epitélio não chega a ficar descontínuo em função do estrato basal de espermatogônias (Fig. 5D,F,G), que pode novamente reiniciar o ciclo

espermatogênico. A cada ciclo espermatogênico, a luz do compartimento germinativo torna-se progressivamente ampla e repleta de espermatozóides (Fig. 5A,F).

Na análise quantitativa, os espermatócitos são as células germinativas em maior quantidade, seguida das espermatogônias, espermatozóides e espermátides (Gráfico 4). Em relação à classe regredida, a luz do compartimento germinativo aumenta (Gráfico 4), e em contrapartida, o interstício diminui em função do desenvolvimento dos cistos (Gráficos 3 e 7). Os granulócitos também estão presentes nesta etapa do ciclo, porém em menor quantidade do que na classe regredida (Gráfico 7).

Quanto ao PCNA, a maturação é o período de maior proliferação das espermatogônias (Fig. 11) (Gráfico 5). Esse dado é atribuído à rápida reposição do epitélio e ao recrutamento das espermatogônias para os sucessivos ciclos espermatogênicos. As células de Sertoli têm atividade mitótica diminuída em relação à classe regredida (Gráficos 5 e 6). A proliferação das células de Sertoli não foi documentada em cistos de espermatócitos e espermátides (Fig. 11). Os espermatócitos possuem marcações nuclear e citoplasmática para o PCNA (Fig. 11A-D). As espermátides apresentam apenas marcação citoplasmática para o PCNA (Fig. 11B,D,E). Não foram encontradas células intersticiais em proliferação (Fig. 11).

A 3 β -HSD localiza-se ao redor de espermatogônias e também no citoplasma das células intersticiais, encontradas próximas da cápsula testicular (Fig. 14 C,D,D-inset).

Classe de Maturação Final

Na maturação final, a atividade proliferativa das espermatogônias diminui, coincidindo com a exaustão das espermatogônias e conseqüentemente com a formação do epitélio germinativo descontínuo (Fig. 6A-D,7) (Gráficos 4 e 5). A maturação final é diagnosticada por apresentar franjas de epitélio totalmente descontínuo, luz ampla e repleta de espermatozóides (Fig. 6A-D,7) (Gráfico 4). O epitélio germinativo é constituído por trechos de células de Sertoli entremeados por poucos e isolados cistos de espermatogônias (Fig. 7B-F). As células de Sertoli possuem fagossomos como evidência da fagocitose de espermatozóides inviáveis (Fig. 7C,D,F,G). Quantitativamente, os espermatozóides são as células germinativas mais abundantes dessa classe reprodutiva (Gráfico 4). O interstício

encontra-se bem reduzido (Fig. 6,7) (Gráficos 3 e 7), e com a menor quantidade de granulócitos em relação as demais classes reprodutivas (Gráfico 7). O repovoamento do epitélio parece ocorrer, gradativamente e lentamente, das extremidades ventro-laterais em direção ao centro da franja (Fig. 6A,E). Além disso, é possível que a liberação dos espermatozóides ocorra a partir dessa classe reprodutiva (Gráfico 1).

Quanto ao PCNA, dispersas e poucas espermatogônias mostram-se em proliferação (Fig. 12). Cistos isolados de espermatócitos e espermátides apresentam marcação citoplasmática e/ou nuclear ao PCNA (Fig. 12C). Poucas células de Sertoli proliferam (Fig. 12D) (Gráficos 5 e 6). A proliferação das células de Sertoli ocorre quando não formam cistos, isto é, no epitélio germinativo descontínuo (Fig. 12D). Células intersticiais não foram encontradas em proliferação (Fig. 12) (Gráfico 6).

A 3 β -HSD localiza-se, de forma tênue, ao longo de todo o epitélio descontínuo, ou seja, no citoplasma das células de Sertoli (Fig. 14E-G). Poucas células intersticiais apresentam reação à 3 β -HSD (Fig. 14E-G).

Classe de Regressão

A regressão é caracterizada pela liberação dos espermatozóides e gradual reposição do epitélio germinativo (Fig. 8,9) (Gráfico 4). As evidências morfológicas e quantitativas desses processos são: redução da luz testicular; diminuição da quantidade de espermatozóides; e aumento do número de espermatogônias (Fig. 8,9) (Gráfico 4). A reposição do epitélio germinativo ocorre a partir das extremidades ventro-laterais em direção ao centro da franja (Fig. 8B,C). Assim, na periferia ventro-lateral, o epitélio é contínuo e composto por apenas espermatogônias e células de Sertoli (Fig. 8B,C,9E), enquanto que na região central, o epitélio é descontínuo e formado por trechos de células de Sertoli entremeados a cistos de espermatogônias (Fig. 8B,C,9A-D). Com a liberação dos espermatozóides, o interstício torna-se, progressivamente, desenvolvido (Fig. 9F) (Gráficos 3 e 7). Em alguns exemplares, o interstício encontra-se desorganizado, com granulócitos e células de núcleo central e citoplasma repleto de vacúolos PAS positivos (Fig. 9C). Células de Leydig dispersas e associadas a granulócitos também podem ser notadas (Fig. 9A-D).

Fagocitose de espermatozoides residuais e figuras mitóticas são comuns nesta etapa do desenvolvimento testicular (final de regressão/início de classe regredida) (Fig. 9F).

O número de espermatogônias em proliferação é numericamente menor em relação à classe anterior, embora, não exista diferença estatisticamente significativa entre elas (Fig. 13) (Gráfico 5). As células de Sertoli proliferam pouco no epitélio germinativo descontínuo (Fig. 13E) (Gráficos 5 e 6). Células intersticiais de núcleo arredondado a alongado também se dividem nessa classe reprodutiva (Fig. 13 C,D) (Gráfico 5). A localização da 3 β -HSD ocorre de forma similar ao da classe regredida.

Discussão

A ordem Siluriformes compreende um grupo de peixes extremamente grande, diverso e amplamente distribuído nas regiões tropicais de todo o mundo (Fink & Fink, 1981; Loir et al., 1989; Nelson, 1994; Reis et al., 2003). Essa diversidade reflete-se na morfologia gonadal, em especial no sistema reprodutor masculino (Loir et al., 1989). Algumas famílias dos Siluriformes apresentam testículo saculiforme, com ou sem região secretora caudal: sem porção secretora – Helogeneidae, Ariidae (Loir et al., 1989) e alguns Loricariidae como *Ancistrus triradiatus* (Mansour & Lahnsteiner, 2003); com porção secretora – Loricariidae, Callichthyidae (Loir et al., 1989). Em outras famílias, o testículo é dividido em: (1) franjas espermatogênicas [incertis sedis, *Conorhynchus conirostris* (Cruz & Santos, 2004), Aspredinidae (Mansour & Lahnsteiner, 2003)]; (2) franjas espermatogênicas craniais e franjas secretoras caudais [alguns Bagridae como *Chrysichthys nigrodigitatus* (Loir et al., 1989), alguns Pimelodidae como *Iheringichthys labrosus* (Santos et al., 2001)]; (3) franjas mistas, com porção espermatogênica e secretora na mesma franja [alguns Bagridae como *Mystus armatus* (Mansour & Lahnsteiner, 2003)]; (4) franjas espermatogênicas craniais, franjas secretoras caudais e franja modificada para armazenamento de espermatozoides [Heptapteridae (Loir et al., 1989)]; e (5) franjas espermatogênicas, franjas secretoras, franjas de armazenamento de espermatozoides e uma estrutura central e ampla de aparência de “favo de mel” (“honeycomb”) denominada de vesícula seminal ou ampola [Auchenipteridae (Loir et al., 1989; Meisner et al., 2000)]. Em *P. maculatus*, os testículos estão divididos em franjas espermatogênicas craniais, franjas

intermediárias de armazenamento de espermatozóides e franjas secretoras caudais. A atividade secretora das franjas caudais dos testículos do Pimelodidae parece estar presente apenas durante a maturação testicular (Santos et al., 2001; Cruz & Santos, 2004). Estudos histoquímicos, conduzidos por Cruz e Santos (2004), apontam a secreção encontrada em *P. maculatus* e *I. labrosus* como constituída principalmente por glicoproteínas neutras e glicoconjugados ácidos. Nesse estudo, também com *P. maculatus*, a secreção das franjas caudais, além de não reagir ao método de detecção de polissacarídeos neutros, apresenta forte reação aos corantes ácidos, expondo o seu caráter básico. Outros trabalhos (ver revisão em Mansour et al., 2004) têm mostrado que a secreção encontrada nos testículos dos teleósteos é constituída principalmente por mucoproteínas, mucopolissacarídeos, esteróides e ferormônios, que aumentam o volume de sêmen durante a maturação, contribuem para a motilidade dos espermatozóides, atração das fêmeas e conseqüentemente para a fertilidade.

Entre os Siluriformes, as estruturas de armazenamento de espermatozóides surgem pela primeira vez nos testículos dos Pimelodidae (Loir et al., 1989). Loir e colaboradores (1989) reportam uma franja modificada curta, de parede musciosa e repleta de espermatozóides nos testículos de *P. ornatus* e em *P. blochii*. Essa estrutura, de difícil localização, também presente nos testículos de *P. maculatus*, não foi documentada em *I. labrosus* (Santos et al., 2001; Cruz & Santos, 2004).

A presença de órgãos acessórios nos testículos dos teleósteos, como vesículas seminais ou estruturas de armazenamento de espermatozóides também têm sido utilizada como um caráter morfológico nos estudos sobre a sistemática e filogenia de alguns grupos de peixes, em especial nos Siluriformes (Loir et al., 1989). Nos Siluriformes, o conhecimento da estrutura testicular e da anatomia das diferentes porções do testículo além de fornecerem subsídios para a melhor compreensão do padrão de evolução gonadal do grupo, compõe um conjunto de dados morfológicos, que juntamente com os dados morfológicos tradicionais (osteológicos e de partes moles), e os dados moleculares, podem ser utilizados no estudo das relações filogenéticas entre as famílias.

As alterações histológicas do epitélio germinativo e os estágios de desenvolvimento das células germinativas permitem descrever 5 classes reprodutivas (regredida, maturação

inicial, maturação intermediária, maturação final e em regressão) durante o ciclo reprodutivo dos Perciformes, como em *Centropomus undecimalis* (Grier & Taylor, 1998; Taylor et al., 1998), *Cynoscion nebulosus* (Brown-Peterson & Warren, 2001), *Rachycentron canadum* (Brown-Peterson et al., 2002) e *Padogobius martensi* (Cinquetti & Dramis, 2003); dos Synbranchiformes, como em *Synbranchus marmoratus* (Lo Nostro et al., 2003); e dos Siluriformes, como em *Pseudoplatystoma fasciatum* (Batlouni et al., 2006). Com base nas alterações morfológicas e morfométricas do epitélio germinativo, 4 classes reprodutivas (regredida, maturação, maturação final e regressão) foram descritas durante o ciclo reprodutivo de *P. maculatus*. Essa classificação difere, em partes, da proposta dos trabalhos supracitados, em função do tipo de reprodução e da estrutura testicular.

A classe regredida de *P. maculatus* é semelhante ao documentado em *C. undecimalis* (Grier & Taylor, 1998; Taylor et al., 1998), *C. nebulosus* (Brown-Peterson & Warren, 2001), *R. canadum* (Brown-Peterson et al., 2002), *S. marmoratus* (Lo Nostro et al., 2003) e *P. martensi* (Cinquetti & Dramis, 2003). O compartimento germinativo de *P. maculatus* é formado por cordões de espermatogônias e células de Sertoli. Como resultado da liberação dos espermatozóides do ciclo anterior, a luz testicular é praticamente obliterada, embora alguns espermatozóides residuais possam ser encontrados na luz remanescente. Lo Nostro e colaboradores (2003) classificam o lúmen testicular da classe regredida em dois tipos: “descontínuo” e “contínuo”. O lúmen “descontínuo” é caracterizado por constrições do compartimento germinativo e com poucos espermatozóides residuais em seu interior. O lúmen “contínuo” ocorre quando o compartimento germinativo não apresenta constrições e possui grande quantidade de espermatozóides residuais. O tipo de lúmen permite inferir a maneira como os espermatozóides foram liberados e conseqüentemente o tipo de reprodução. Em *S. marmoratus*, a liberação dos gametas é parcelada (Lo Nostro et al., 2003), com colabamento parcial do órgão, e portanto, lúmen “descontínuo”. Em modelos de reprodução contínua, a liberação dos espermatozóides é constante, e portanto, lúmen “contínuo”. Em *P. maculatus*, as características do lúmen permitem inferir que a liberação dos

espermatozóides é parcelada, como reflexo do testículo colabado e com raros trechos de luz durante a classe regredida.

O período de maturação dos Perciformes, como *C. undecimalis* (Grier & Taylor, 1998; Taylor et al., 1998), *C. nebulosus* (Brown-Peterson & Warren, 2001), *R. canadum* (Brown-Peterson et al., 2002), *P. martensi* (Cinquetti & Dramis, 2003); e dos Synbranchiformes, como *S. marmoratus* (Lo Nostro et al., 2003) é dividido em maturação inicial, maturação intermediária e maturação final. Em *P. maculatus*, o período de maturação compreende as classes de maturação e maturação final. Isso ocorre devido à diferença entre a estrutura testicular dos Percomorpha e de *P. maculatus* (Ostariophysi). Os Percomorpha possuem testículo do tipo lobular, em que o compartimento germinativo termina em fundo cego (digitiforme) nas extremidades ventro-laterais do testículo (Parenti & Grier, 2004). Nos Ostariophysi, o testículo possui uma rede de túbulos que se anastomosam desde a periferia até o ducto testicular (Parenti & Grier, 2004). Por essa diferença anatômica, o processo de maturação não é igual entre os Percomorpha e os Ostariophysi. Nos Percomorpha estudados, a maturação inicial é caracterizada por um epitélio germinativo contínuo ao longo de toda extensão dos lóbulos (Grier, 2002). Na maturação intermediária, a espermiacção seguida de não reposição de células germinativas torna o epitélio germinativo descontínuo na região próxima ao ducto, enquanto que nas extremidades (junto da cápsula testicular) o epitélio é ainda contínuo (Grier, 2002). Na maturação final, o epitélio germinativo descontínuo atinge toda extensão dos lóbulos (Grier, 2002). Em *P. maculatus*, a porção distal das franjas exibe epitélio germinativo contínuo; a parte apical (próxima ao ducto testicular) apresenta epitélio descontínuo, com luz ampla e cheia de espermatozóides. Por outro lado, em etapas mais posteriores, a situação inverte-se: com epitélio descontínuo e repleto de espermatozóides na porção distal, e epitélio contínuo na região próxima ao ducto testicular. Essas observações sugerem que o ciclo espermatogênico em *P. maculatus* é assíncronico e ocorre mais de uma vez em cada porção da franja. A ocorrência de sucessivos ciclos espermatogênicos em cada porção da franja deve-se à cinética do epitélio germinativo, em especial ao rápido *turnover* das espermatogônias, como nas análises morfológicas e pela detecção do PCNA. O período de maturação testicular em *P. maculatus*, apresenta, portanto características peculiares, as

quais indicam apenas duas classes (maturação e maturação final) e não três classes (em maturação inicial, maturação intermediária e maturação final) como nos Perciformes e Synbranchiformes supracitados (Grier, 2002; Lo Nostro et al., 2003).

A correlação entre o índice gonadosomático e as classes reprodutivas também permite inferir sobre a frequência de liberação dos espermatozoides. Em *C. undecimalis* (Grier & Taylor, 1998; Taylor et al., 1998), o IGS atinge seu maior valor na maturação intermediária e diminui na maturação final. Em *S. marmoratus* (Lo Nostro et al., 2003), o IGS tem seu maior valor na maturação final e diminui progressivamente até a regressão. As diferenças de IGS observadas entre *C. undecimalis* (Grier & Taylor, 1998; Taylor et al., 1998) e *S. marmoratus* (Lo Nostro et al., 2003) refletem diferentes frequências de liberação de espermatozoides. A frequência em *C. undecimalis* é elevada (1.6 dias) (Grier & Taylor, 1998; Taylor et al., 1998) e a liberação dos espermatozoides já ocorre na classe de maturação intermediária. Em *S. marmoratus* (Lo Nostro et al., 2003) a frequência é baixa e a liberação dos espermatozoides ocorre a partir da classe de maturação final. Os dados de *P. maculatus* sugerem que a liberação dos espermatozoides ocorre a partir da maturação (a maturação apresenta maior valor de IGS, porém estatisticamente não difere do IGS da maturação final). Assim, a frequência de liberação de espermatozoides em *P. maculatus* deve ser elevada.

Também é possível relacionar o IGS e o número de espermatogônias em proliferação. A atividade proliferativa das espermatogônias é baixa na classe regredida e atribuída à divisão das espermatogônias tronco. Durante a espermatogênese, o número de espermatogônias em proliferação é grande, e indica que as espermatogônias estão constantemente sendo recrutadas para o ciclo espermatogênico. Esse dado reflete-se em um IGS elevado, como também ocorre em *Spaurus aurata* (Chaves-Pozo et al., 2005). Na maturação final, a atividade proliferativa das espermatogônias diminui, coincidindo com a exaustão das espermatogônias e a formação do epitélio germinativo descontínuo. No entanto, o repovoamento do epitélio germinativo ocorre, gradativamente, das extremidades ventro-laterais em direção ao centro da franja. Ao final da regressão todo o epitélio está contínuo e formado por espermatogônias para reiniciar, novamente, o ciclo reprodutivo.

Na classe regredida de *P. maculatus*, as células de Sertoli também expressam o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Vários trabalhos têm reportado a divisão das células de Sertoli, em peixes adultos (Billard, 1969; Grier, 1993; Koulisch et al., 2002; Lo Nostro et al., 2003; Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2003; Chaves-Pozo et al., 2005; Schulz et al., 2005). A divisão das células de Sertoli é considerada como responsável direto pelo aumento do testículo a cada ciclo reprodutivo (Schulz et al., 2005) e pelo aumento da produção espermática (Matta et al., 2002). Nos mamíferos, as células de Sertoli não proliferam em animais adultos (França & Russell, 1998), o que limita sua produção espermática. Em *S. marmoratus*, a divisão das células de Sertoli ocorre quando estão associadas a cistos de espermatogônias durante a classe regredida (Lo Nostro et al., 2003). Em *Thalassoma bifasciatum* (Koulisch et al., 2002) a divisão da célula de Sertoli é encontrada em cistos de espermátides; e em *Oreochromis niloticus* (Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005) há um aumento gradual de células de Sertoli durante o início da espermatogênese, com seu número estabilizado nos cistos de espermátócitos. Em *P. maculatus*, a proliferação das células de Sertoli é intensa durante a classe regredida e ocorre, em geral, quando as células de Sertoli estão associadas a espermatogônias que não se dividem. Esse resultado sugere que a proliferação das células de Sertoli antecede à proliferação espermatogonial, no intuito de garantir um número adequado para suportar o posterior crescimento do cisto. A proliferação das células de Sertoli no testículo regredido de *P. maculatus* também contribui para o crescimento testicular e conseqüente aumento da produção espermática a cada ciclo reprodutivo.

Nos peixes teleósteos, o número de células de Sertoli influencia a produção final de espermatozóides (Matta et al., 2002). O controle da divisão das células de Sertoli tem sido investigado em peixes de interesse econômico (Matta et al., 2002; Schulz et al., 2005). Matta e colaboradores (2002) mostram que os hormônios tireoidianos influenciam na diferenciação e proliferação das células de Sertoli de *O. niloticus*. O hipotireoidismo neonatal transitório induzido aumenta o período de proliferação das células de Sertoli e conseqüentemente o número de células de Sertoli por cisto. Schulz e colaboradores (2003) mostram, experimentalmente que a 11-KT (cetotestosterona) e o FSH estimulam a proliferação das células de Sertoli em indivíduos adultos de *Clarias gariepinus*. Esses

dados, apesar de substanciais, ainda não são suficientes, para o entendimento dos mecanismos de proliferação das células de Sertoli dos peixes.

Na classe regredida de *P. maculatus*, células intersticiais de aspecto fusiforme respondem à marcação pelo PCNA. A proliferação de células intersticiais também foi documentada em testículos regredidos de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) (Bouma et al., 2003) quando submetidos *in vitro* ao estradiol 17- β (E2). Bouma e Nagler (2001) detectam receptores de estrógeno em células intersticiais (Bouma & Nagler, 2001) e sugerem o papel do E2 na proliferação e diferenciação de células de Leydig dos testículos regredidos. Em *P. maculatus*, as células fusiformes em divisão são atribuídas como precursores das células de Leydig, que sob determinados estímulos (provavelmente o E2) proliferam e se diferenciam em células esteroidogênicas.

A maior proporção de granulócitos ocorre na classe regredida de *P. maculatus*. Esse dado sugere (1) que os granulócitos podem ser capazes, também nos peixes, de produzir interleucina IL-1 β , um regulador positivo para proliferação de espermatogônias como comprovado em mamíferos (ver revisão – Chaves-Pozo et al., 2005) e/ou (2) que os granulócitos seriam capazes de estimular a esteroidogênese nas células de Leydig como também visto em mamíferos (ver revisão – Cinquetti & Dramis, 2003).

A atividade da 3 β -HSD é baixa durante a classe regredida de *P. maculatus* e intensa durante a maturação. Este dado também tem sido relatado em outros teleósteos (ver Kobayashi et al., 1996; Lo Nostro et al., 2004; Cinquetti & Dramis, 2003). Na classe regredida, a 3 β -HSD está ausente no interstício e, no compartimento germinativo parece localizar-se ao redor das espermatogônias, ou seja, no citoplasma das células de Sertoli. A 3 β -HSD também foi detectada nas células de Sertoli durante o ciclo reprodutivo de *Salmo gairneri* (van den Hurk et al., 1978). No entanto, a capacidade esteroidogênica das células de Sertoli nos peixes é ainda incerta e necessita ser melhor investigada. Na maturação de *P. maculatus*, a 3 β -HSD localiza-se ao redor de espermatogônias e nas células de Leydig do interstício. Durante a maturação final até a regressão, a intensidade da 3 β -HSD diminui, concentrando-se em grupos de células de Leydig e muito fracamente no epitélio descontínuo. As observações de marcação para a 3 β -HSD durante o ciclo de *P. maculatus* sugerem que a espermatogênese/espermio gênese (maturação) e a liberação dos

espermatozoides (maturação final) são mais dependentes de andrógenos do que a regressão testicular e a proliferação espermatogonial.

Literatura Citada

- Azevedo P. 1972. Principais peixes das águas interiores de São Paulo, hábitos de vida. In: Poluição e Piscicultura. São Paulo, CIBPU, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, p.109-112.
- Batlouni SR, Romagosa E, Borella MI. 2006. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addresses to aquaculture. Anim Reprod Sci doi:10.1016/j.anireprosci.2005.11.012.
- Bazzoli N, Cangussu LCV, Rizzo E, Santos GB. 1997. Reprodução e desova de mandis *Pimelodus maculatus* e *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) nos reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. BIOS, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas, 5(5):7-15.
- Billard R. 1969. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata* I. Estimation du nombre de generations goniales et rendement de la spermatogenèse. Ann Biol Bioch Biophys 9:251-271.
- Borges Filho OF. 1987. Caracterização dos estádios de maturação e correlação com avaliações histoquímico-enzimáticas e ultra-estruturais das células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo do *Prochilodus scrofa* – Steindachner, 1881. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bouma J, Nagler JJ. 2001. Estrogen Receptor-alpha protein localization in the testis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle. Biol Reprod 65:60-65.
- Bouma J, Cloud JG, Nagler JJ. 2003. In vitro effects of estradiol-17beta on myoid and fibroblastic cell proliferation in the immature rainbow trout testis. Fish Physiol Biochem 28:191-192.
- Brown-Peterson NJ, Warren JW. 2001. The reproductive biology of spotted sea trout, *Cynoscion nebulosus*, along the Mississippi Gulf Coast. Gulf Mex Sci 2001:61-73.
- Brown-Peterson NJ, Grier HJ, Overstreet RM. 2002. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. J Fish Biol 60:178-202.
- Callard GV, Callard IP. 1999. Spermatogenesis, in nonmammals. In: Knobil E, Neill JD, editors. Encyclopedia of Reproduction, vol. 4. San Diego, CA: Academic Press. p 563-570.
- Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J, Ayala AG. 2005. An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Biol Reprod 72:593-601.
- Chieffi P, Nasti M, Fulgione D, Franco R. 2001. Expression of PCNA in the testis of the lizard, *Podarcis s. sicula*: an endogenous molecular marker of mitotic germinal epithelium proliferation. Zygote 9:317-322.

- Cinquetti R, Dramis L. 2003. Histological, histochemical, enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* between annual breeding seasons. *J Fish Biol* 63:1402-1428.
- Cruz RJG, Santos JE. 2004. Testicular structure of three species of neotropical freshwater pimelodids (Pisces, Pimelodidae). *Rev Brasil Zool* 21(2):267-271.
- Fenerich NA. 1975. Hipófise de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Teleostei). Morfologia e variações em relação com o ciclo ovário. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Fink SV, Fink WL. 1981. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool J Linn Soc, London*, 72:297-353.
- França LR, Russell LD. 1998. The testis of domestic animals. In: Martínez-García F, Regadera J, editors. Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications 1998:198-219.
- Godinho HM, Fenerich NA, Basile-Martins MA, Barker JMB. 1974. Maturation curve of the ovary of *Pimelodus maculatus* Lac., (Siluroidei, Teleostei). *B Inst Pesca* 3(1):1-20.
- Godinho HM, Basile-Martins MA, Fenerich NA, Narahara NY. 1977. Fecundidade e tipo de desova do mandi, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces, Siluroidei). *Rev Brasil Biol* 37(4):737-744.
- Godoy MP. 1987. Peixes do Estado de Santa Catarina, Florianópolis. Editora da UFSC, co-edição Eletrosul/FURB, p. 572.
- Grier HJ. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russell LD, Griswold MD, editors. The Sertoli cell. Clearwater, FL: Cache River Press. p 704-739.
- Grier H. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J Morphol* 243:265-281.
- Grier HJ. 2002. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Creswell RL, editor. Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, November 2000. Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium. p 537-552.
- Grier HJ, Taylor RG. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. *J Fish Biol* 53:521-542.
- Grier H, Lo Nostro F. 2000. The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In: Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO, editors. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norway: University of Bergen. p 233-236.
- Kang MJ, Kim MK, Terhune A, Park JK, Kim YH, Koh GY. 1997. Cytoplasmic localization of cyclin D3 in seminiferous tubules during testicular development. *Exp Cell Res* 234:27-36.
- Koulis S, Kramer CR, Grier HJ. 2002. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J Morphol* 254:292-311.
- Lo Nostro F, Grier H, Andreone L, Guerrero GA. 2003. Involvement of the gonadal germinal epithelium during sex reversal and seasonal testicular cycling in the

- protogynous swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). J Morphol 257:107-126.
- Lo Nostro FL, Antoneli FN, Quagio-Grassiotto I, Guerrero GA. 2004. Testicular interstitial cells, and steroidogenic detection in the protogynous fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). Tissue Cell 36:221-231.
- Lair M, Cauty C, Planquette P, Le Bail P-Y. 1989. Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes. Aquat Living Resour 2:45-56.
- Mansour N, Lahnsteiner F. 2003. Morphology of the male genitalia and sperm fine structure in siluroid fish. J Submicrosc Cytol Pathol 35(3):277-285.
- Mansour N, Lahnsteiner F, Patzner, RA. 2004. Seminal vesicle secretion of african catfish, its composition, its behaviour in water and saline solutions an its influence on gamete fertilizability. J Exp Zool A 301:745-755.
- Matta SLP, Vilela DAR, Godinho HP, França LR. 2002. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. Endocrinology 143:970-978.
- Meisner AD, Burns JR, Weitzman SH, Malabarba LR. 2000. Morphology and histology of the male reproductive system in two species of internally inseminating South American catfishes, *Trachelyopterus lucenai* and *T. galeatus* (Teleostei: Auchenipteridae). J Morphol 246:131-141.
- Miura C, Miura T, Yamashita M. 2002. PCNA protein expression during spermatogenesis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). Zool Science 19:87-91.
- Miura T, Miura CI. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. Fish Physiol Biochem 28:181-186.
- Nelson JS. 1994. Fishes of the world, 3rd ed. New York: John Wiley & Sons. p 600.
- Parenti LR, Grier, HJ. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. Integr Comp Biol 44:333-348.
- Pudney J. 1993. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: Russell LD, Griswold MD, editors. The Sertoli cell. Clearwater, FL: Cache River Press. p 611-657.
- Pudney J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. Microsc Res Tech 32:459-497.
- Quintero-Hunter I, Grier H, Muscato M. 1991. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. Biotech Histochem 66:169-172.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris C. (Eds.) 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), Porto Alegre: Edipucrs.
- Santos JE, Bazzoli N, Rizzo E, Santos GB. 2001. Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). Tissue Cell 33(5):533-540.
- Schulz RW. 2003. Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. ARBS Annu Rev Biomed Sci 5:57-68.
- Schulz RW, Miura T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiol Biochem 26:43-56.

- Schulz RW, van Dijk W, Bogerd J. 2003. Sertoli cell proliferation and FSH signaling in african catfish, *Clarias gariepinus*. Fish Physiol Biochem 28:223-224.
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR, Godinho HP. 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis – evidence from two fish species belonging to different orders. Biol Reprod 73:891-898.
- Taylor RG, Grier HJ, Whittington JA. 1998. Spawning rhythms of common snook in Florida. J Fish Biol 53:502-520.
- Van den Hurk R, Peute J, Vermeij JAJ. 1978. Morphological and enzyme cytochemical aspects of the testis and vas deferens of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. Cell Tissue Res 186:309-325.
- Vilela DAR, Silva SGB, Peixoto MTD, Godinho HP, França LR. 2003. Spermatogenesis in teleost: insights from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. Fish Physiol Biochem 28:187-190.
- Yazawa T, Yamamoto T, Nakayama Y, Hamada S, Abé S-I. 2000. Conversion from mitosis to meiosis: morphology and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Dmc1 during newt spermatogenesis. Develop Growth Differ 42:603-611.

Legenda das Figuras

Figura 1. Os testículos de *P. maculatus*. **A-L:** Cápsula testicular (*tc*); célula muscular lisa (*smc*); compartimento germinativo (*gc*); compartimento intersticial (*ic*); ducto espermático (*sd*); ducto testicular principal (*md*); espermatozóides (*SZ*); franja (*frg*); franja espermatogênica (*sp frg*); franja intermediária (*int frg*); franja secretora (*scr frg*); porção espermatogênica (*sp*); porção intermediária (*int*); porção secretora (*scr*); túbulos anastomosados (*at*). **A,C:** Testículo em maturação final. **B:** Testículo em maturação. **D:** Testículo regredido. **F:** Franja intermediária. *Asterisco* mostra luz colabada e sem secreção. **G,H:** Franja secretora em diferentes etapas da biossíntese e acúmulo de secreção (*scr frg**). **G:** *Asterisco* indica secreção granular; *asterisco duplo* mostra secreção homogênea e abundante. **H:** *Asterisco* mostra secreção homogênea e abundante. **I:** Detalhe da região delimitada em **F**. *Asterisco* indica o epitélio de revestimento da franja intermediária. **J:** Aumento da região delimitada em **G**. *Asterisco* mostra que parte do citoplasma da célula destaca-se para formar a secreção (secreção apócrina). **K:** Detalhe da região delimitada em **G**. Epitélio secretor (*asterisco*); secreção (*asterisco duplo*). **L:** Aumento da região delimitada em **H**. Epitélio secretor (*asterisco*); secreção (*asterisco duplo*). **E,G,H,J:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **F,I,K,L:** Hematoxilina/Eosina. **C,D:** Barra= 1,0cm; **E,G,H:** Barra= 100µm; **F:** Barra= 200µm; **I,J-L:** Barra= 10µm.

Figura 1

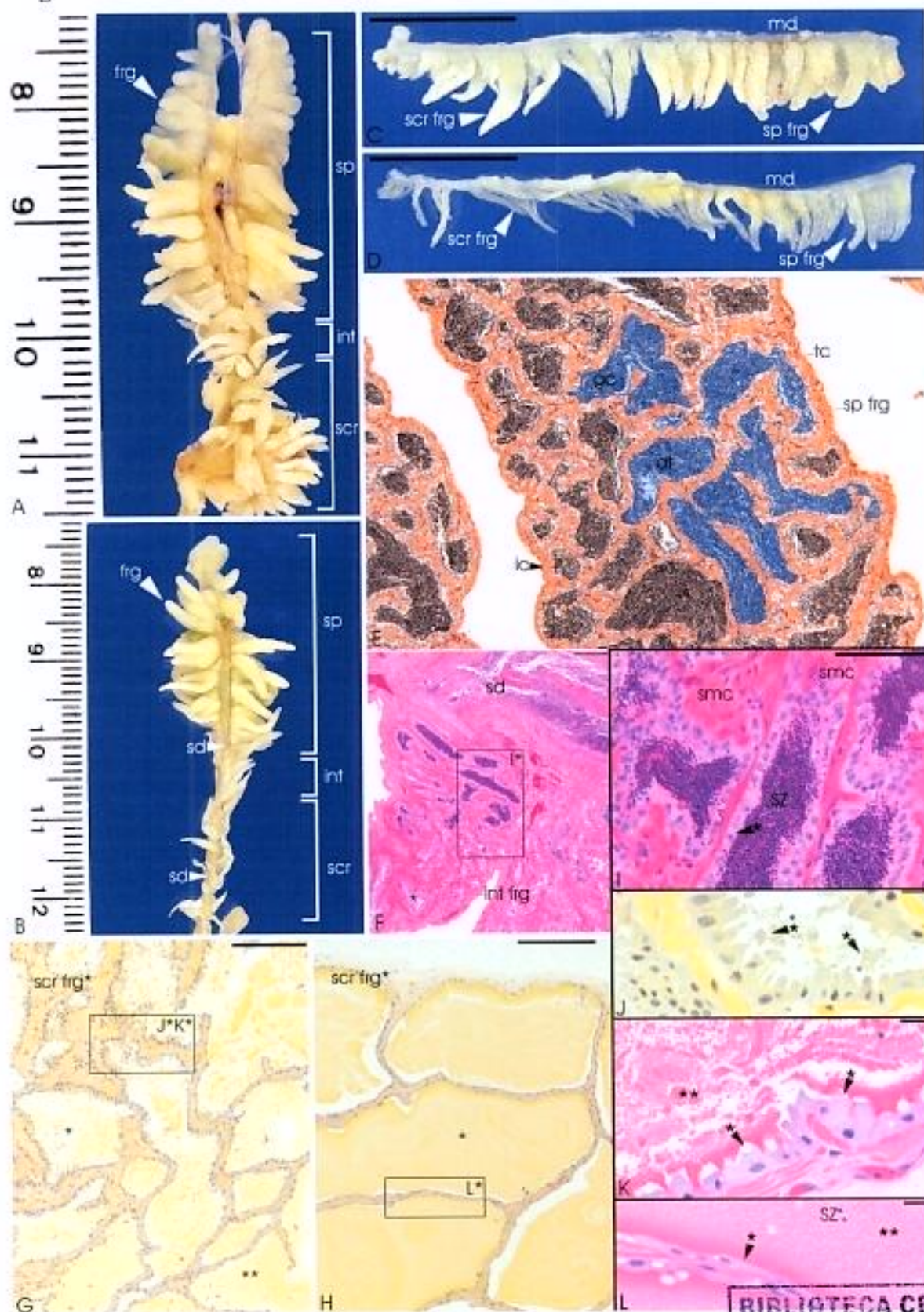
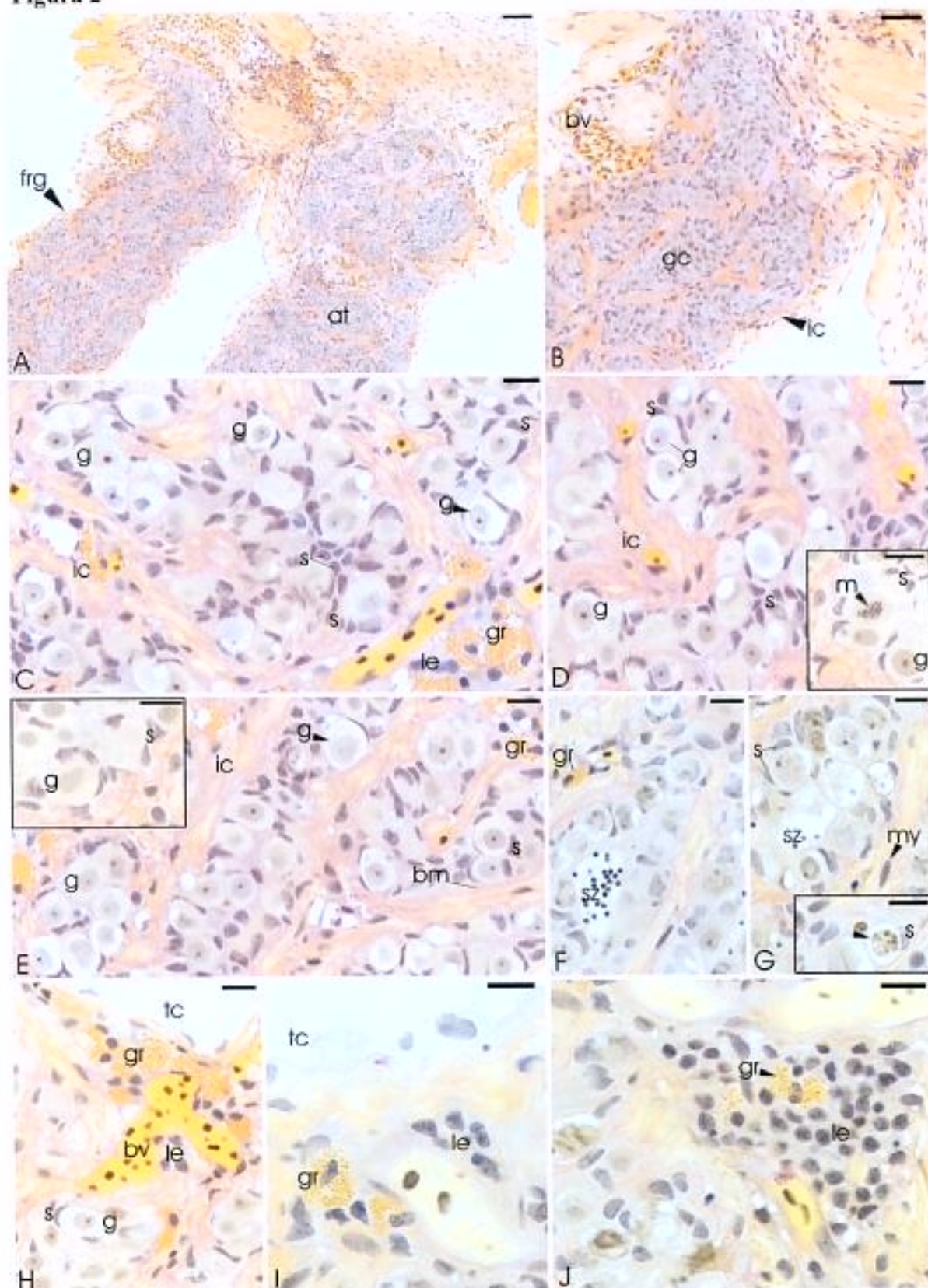


Figura 2. Classe regredida de *P. maculatus*. **A-J:** Cápsula testicular (*tc*); células de Leydig (*le*); célula mióide (*my*); células de Sertoli (*s*); compartimento germinativo (*gc*); compartimento intersticial (*ic*); espermatogônias (*g*); espermatozóides residuais (*SZ*); franja espermatogênica (*frg*); granulócitos (*gr*); membrana basal (*bm*); metáfase (*m*); túbulos anastomosados (*at*); vaso sanguíneo (*bv*). **G-inset:** Fagossomo (*cabeça de seta*) no interior da célula de Sertoli. **A-J:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **A:** Barra= 50µm; **B:** Barra= 30µm; **C-J:** Barra= 10µm.

Figura 2



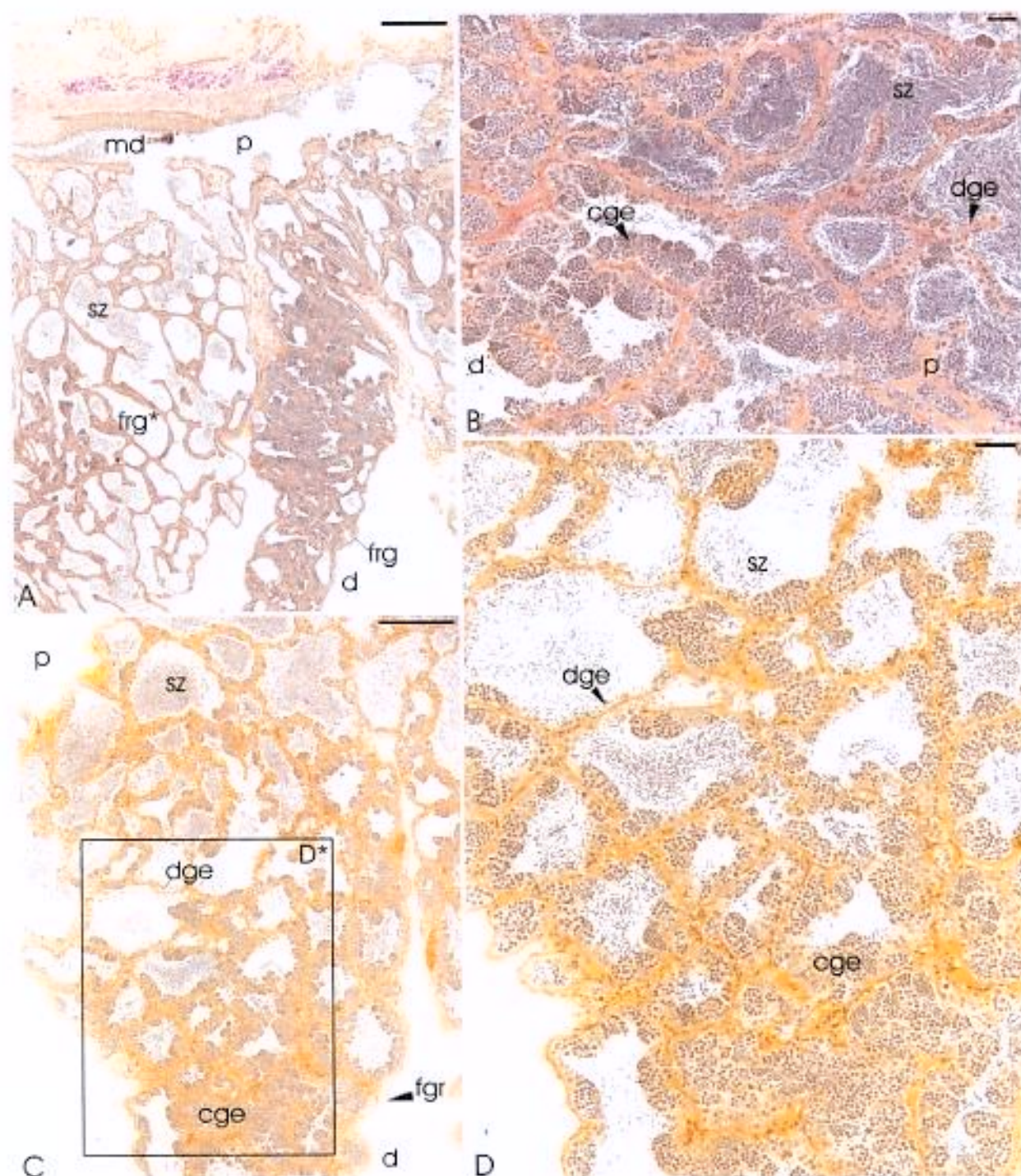


Figura 3. Classe de maturação em *P. maculatus*. **A-D:** Ducto testicular principal (*md*); epitélio germinativo contínuo (*cge*); epitélio germinativo descontínuo (*dge*); espermatozoides (*SZ*); franja espermatogênica (*frg* ou *fgr*); franja espermatogênica em maturação assincrônica (*frg**); região distal (*d*); região proximal (*p*). **D:** Região delimitada em **C**. **A-D:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **A,C:** Barra= 200µm; **B:** Barra= 30µm; **D:** Barra= 50µm.

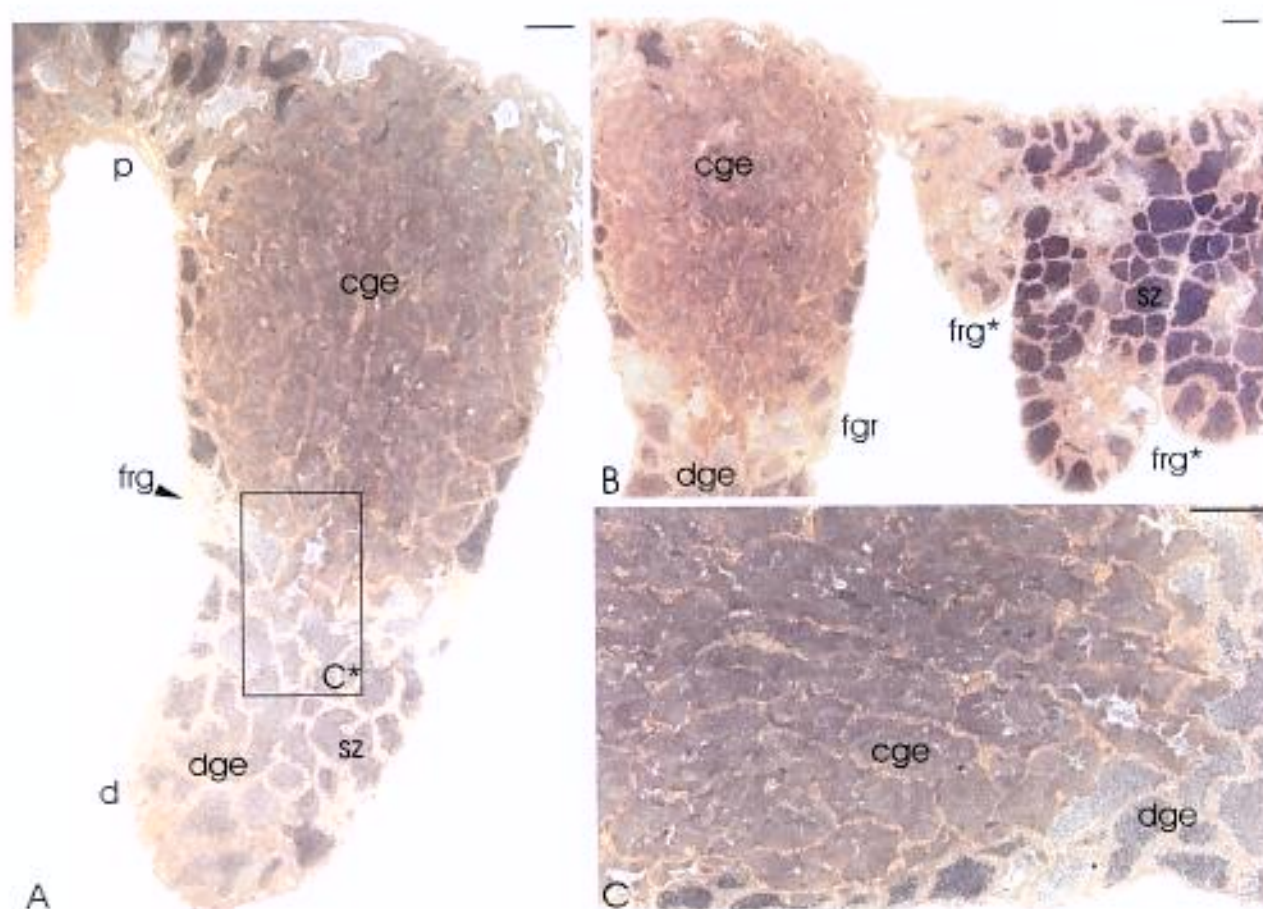
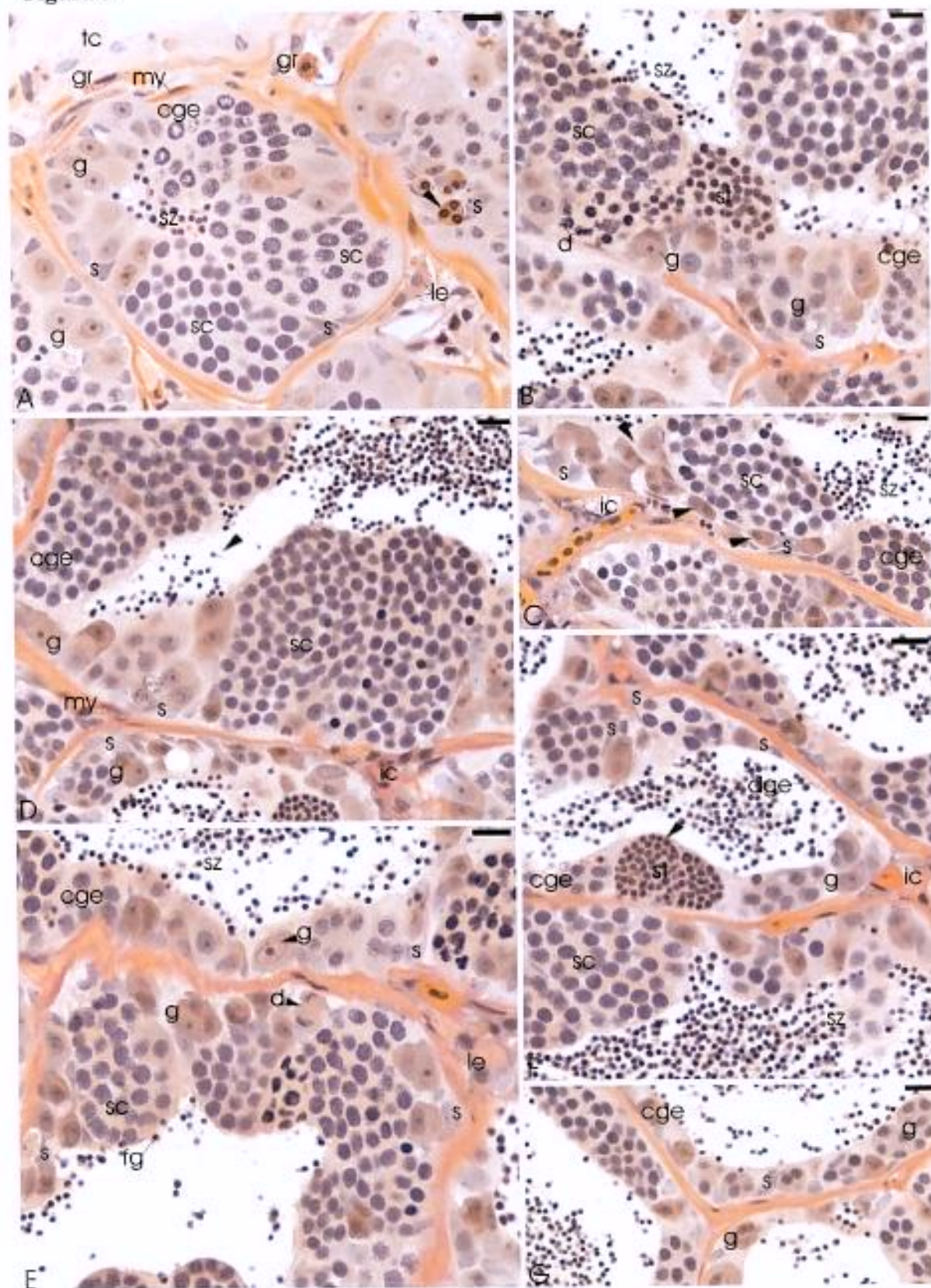


Figura 4. Classe de maturação em *P. maculatus*. A-C: Epitélio germinativo contínuo (cge); epitélio germinativo descontínuo (dge); espermatozóides (SZ); franja espermatogênica (frg ou fgr); franja espermatogênica em maturação assincrônica (frg*); região distal (d); região proximal (p). C: Região delimitada em A. A-C: PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. A-C: Barra= 200µm.

Figura 5. Classe de maturação em *P. maculatus*. **A-G:** Cápsula testicular (*tc*); células de Leydig (*le*); célula mioide (*my*); células de Sertoli (*s*); compartimento intersticial (*ic*); divisão celular (*d*); epitélio germinativo contínuo (*cge*); epitélio germinativo descontínuo (*dge*); espermátides (*st*); espermatócitos (*sc*); espermatogônias (*g*); espermatozóides (*SZ*); fagossomo (*fg*); granulócitos (*gr*). **A:** *Cabeça de seta* indica corpos apoptóticos de células germinativas fagocitados pelas células de Sertoli. **C:** *Cabeças de setas* indicam que os cistos de espermatogônias formam um estrato basal no epitélio germinativo. Notar cistos apicais de células germinativas em desenvolvimento mais avançado. **D:** Espermição nas regiões de estratificação (*cabeça de seta*). Observar que o epitélio não se torna descontínuo. **F:** Região sem estratificação. A *cabeça de seta* mostra que a espermição deste cisto resultará em um epitélio germinativo descontínuo. **A-G:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **A-G:** Barra= 10µm.

Figura 5



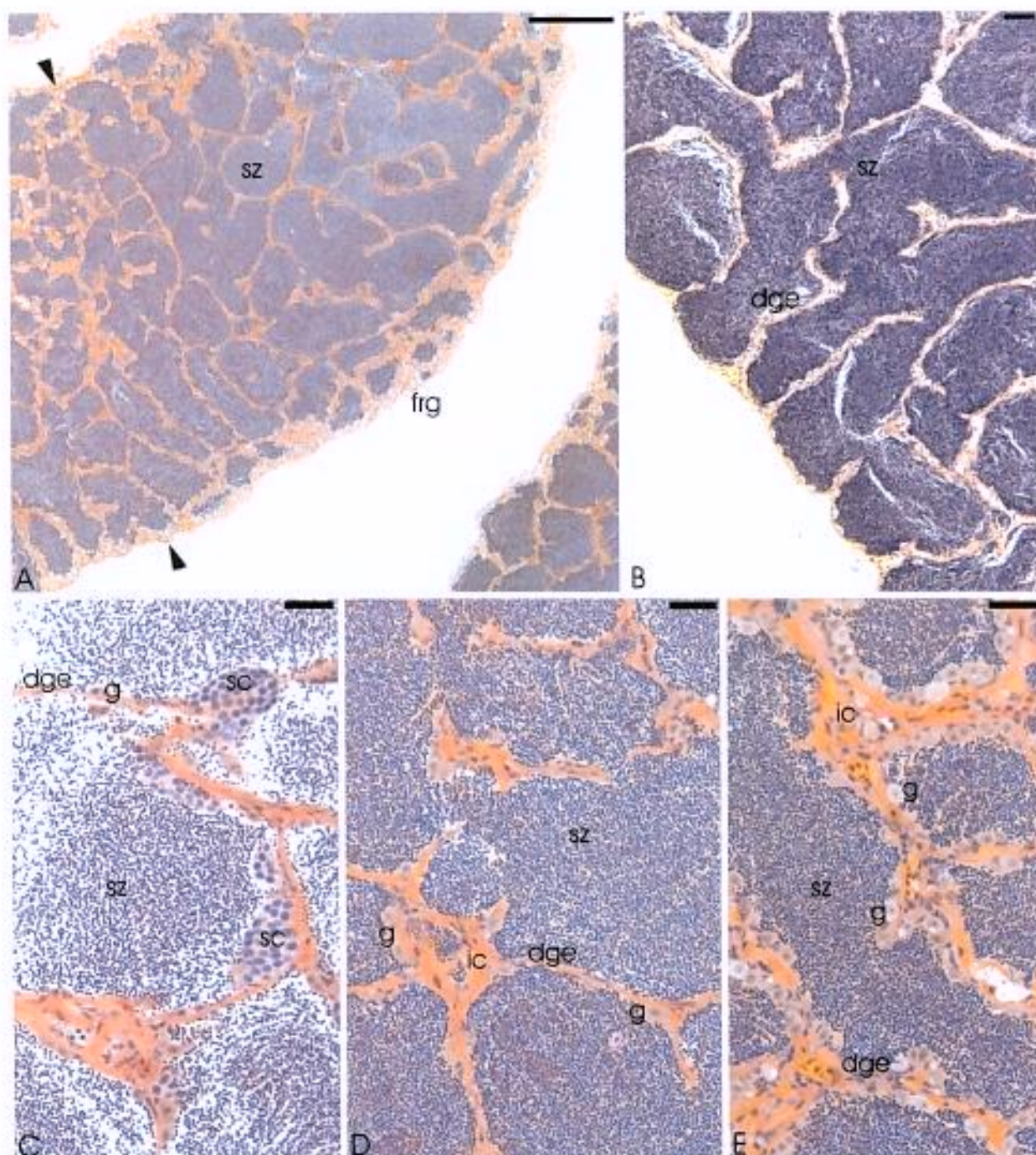
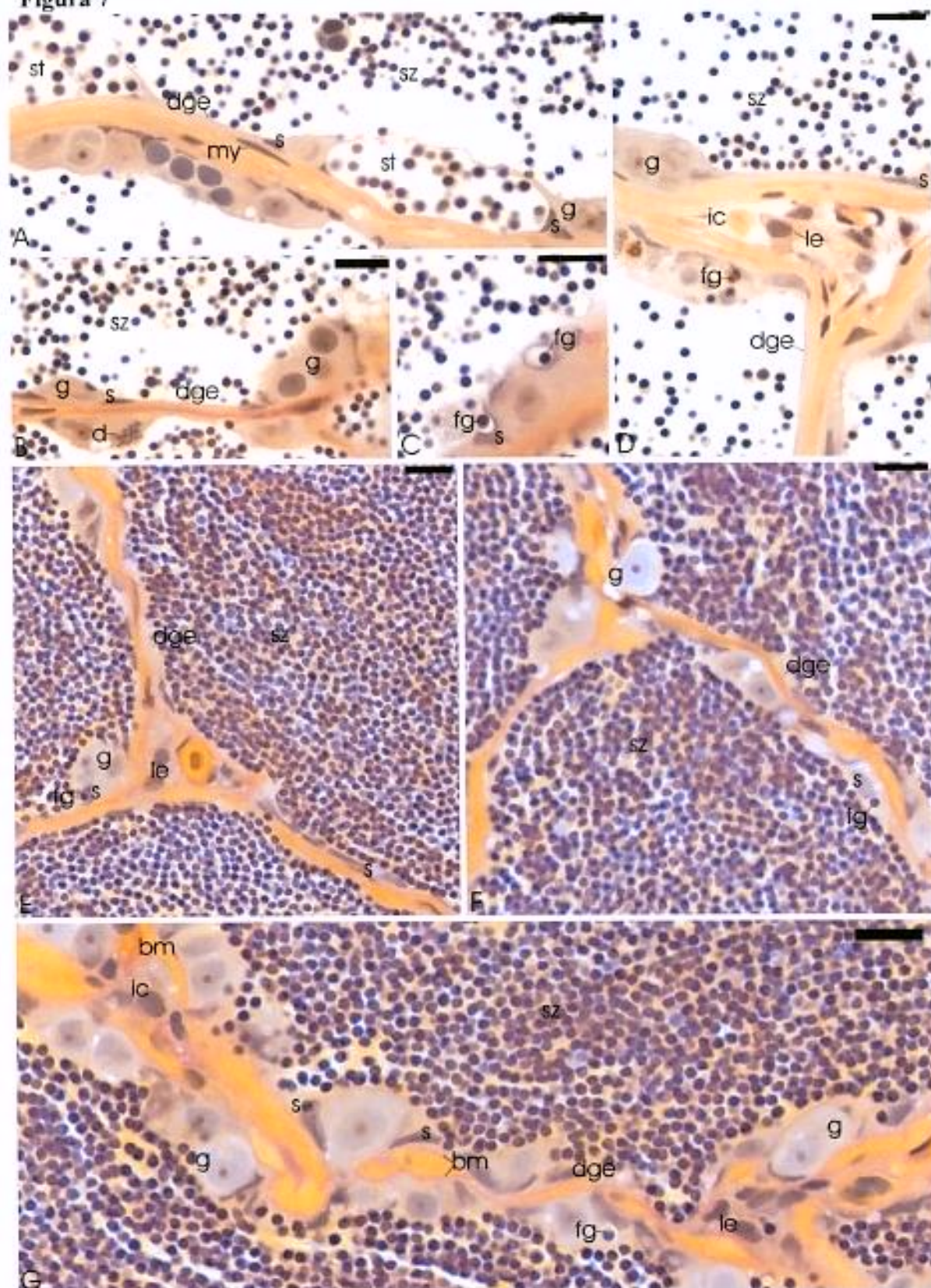


Figura 6. Classe de maturação final em *P. maculatus*. **A-E:** Compartimento intersticial (ic); epitélio germinativo descontinuo (dge); espermatócitos (sc); espermatogônias (g); espermatozóides (SZ); franja espermatogênica (frg). **A:** Cabeças de setas indicam o repovoamento do epitélio germinativo das extremidades ventro-laterais em direção ao centro da franja. **A-E:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **A:** Barra= 200µm; **B:** Barra= 50µm; **C-E:** Barra= 30µm.

Figura 7. Classe de maturação final de *P. maculatus*. **A-G:** células de Leydig (*le*); célula mióide (*my*); células de Sertoli (*s*); divisão celular (*d*); compartimento intersticial (*ic*); epitélio germinativo descontínuo (*dge*); espermatídes (*st*); espermatogônias (*g*); espermatozóides (*SZ*); fagossomo (*fg*); membrana basal (*bm*). Notar que progressivamente a espermição torna o epitélio germinativo descontínuo por toda sua extensão. **A-G:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **A-G:** Barra= 10µm.

Figura 7



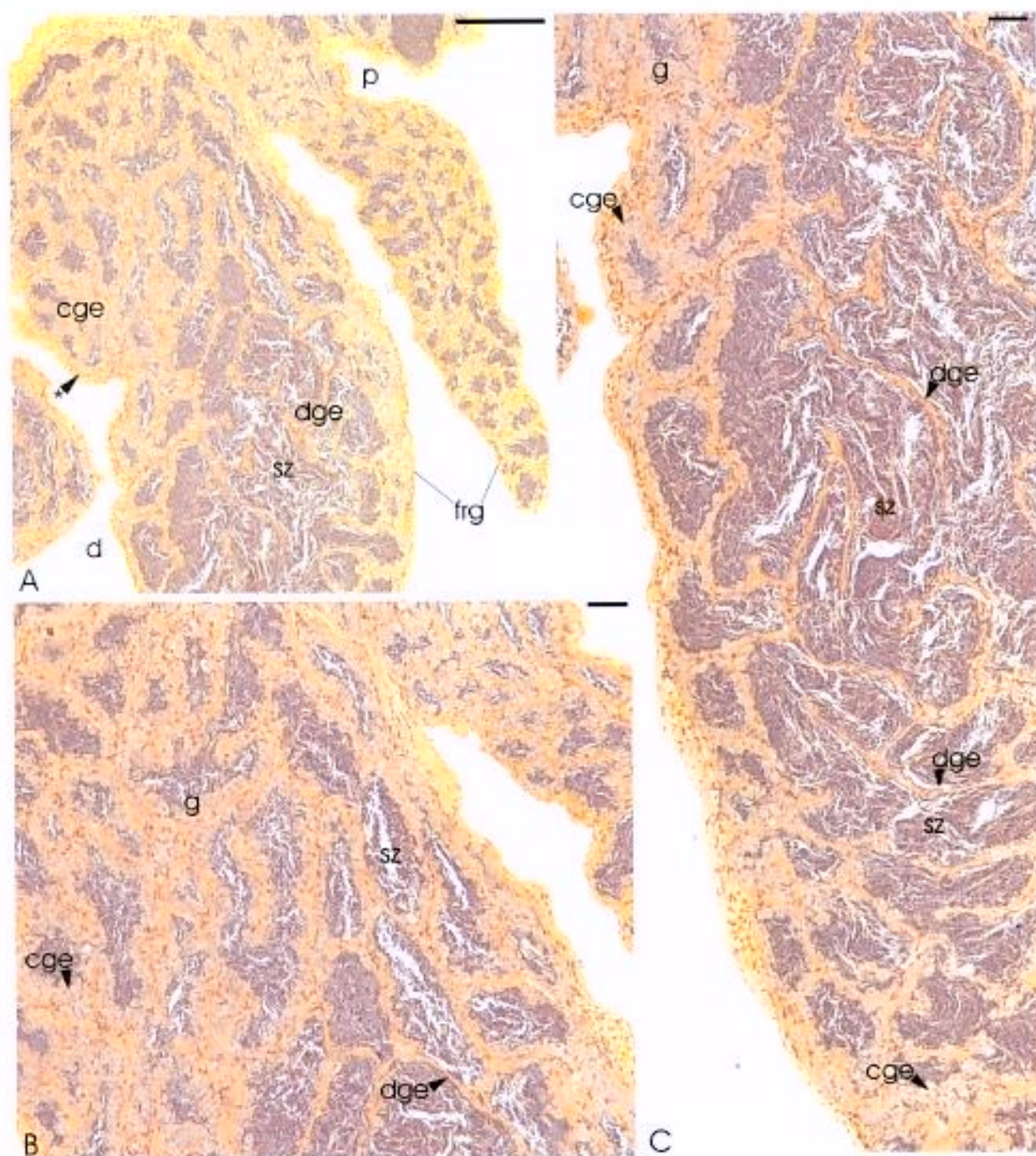


Figura 8. Classe de regressão em *P. maculatus*. A-C: Epitélio germinativo contínuo (cge); epitélio germinativo descontínuo (dge); espermatogônias (g); espermatozóides (SZ); franja espermatogênica (frg); região distal (d); região proximal (p). A: *Asterico* mostra que o repovoamento do epitélio germinativo ocorre das extremidades ventro-laterais em direção ao centro da franja. A-C: PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. A: Barra= 200µm; B,C: Barra= 50µm.

Figura 9. Classe de regressão em *P. maculatus*. **A-F:** Células de Leydig (*le*); célula mióide (*my*); células de Sertoli (*s*); compartimento intersticial (*ic*); compartimento intersticial proeminente e desorganizado (*ic**); epitélio germinativo contínuo (*cge*); epitélio germinativo descontínuo (*dge*); espermatogônias (*g*); espermatozóides (*SZ*); fagossomo (*fg*); granulócitos (*gr*); metáfase (*m*); vaso sanguíneo (*bv*). **C:** Cabeça de seta indica célula intersticial com citoplasma vacuolizado e PAS positivo. **E:** Cabeças de setas opostas/asterisco mostram a tendência de constrição do compartimento germinativo em resposta à liberação dos espermatozóides. **F:** Asteriscos mostram a constrição do compartimento germinativo, como evidência da liberação dos espermatozóides. **A-F:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. **A-F:** Barra= 10µm.

Figura 9

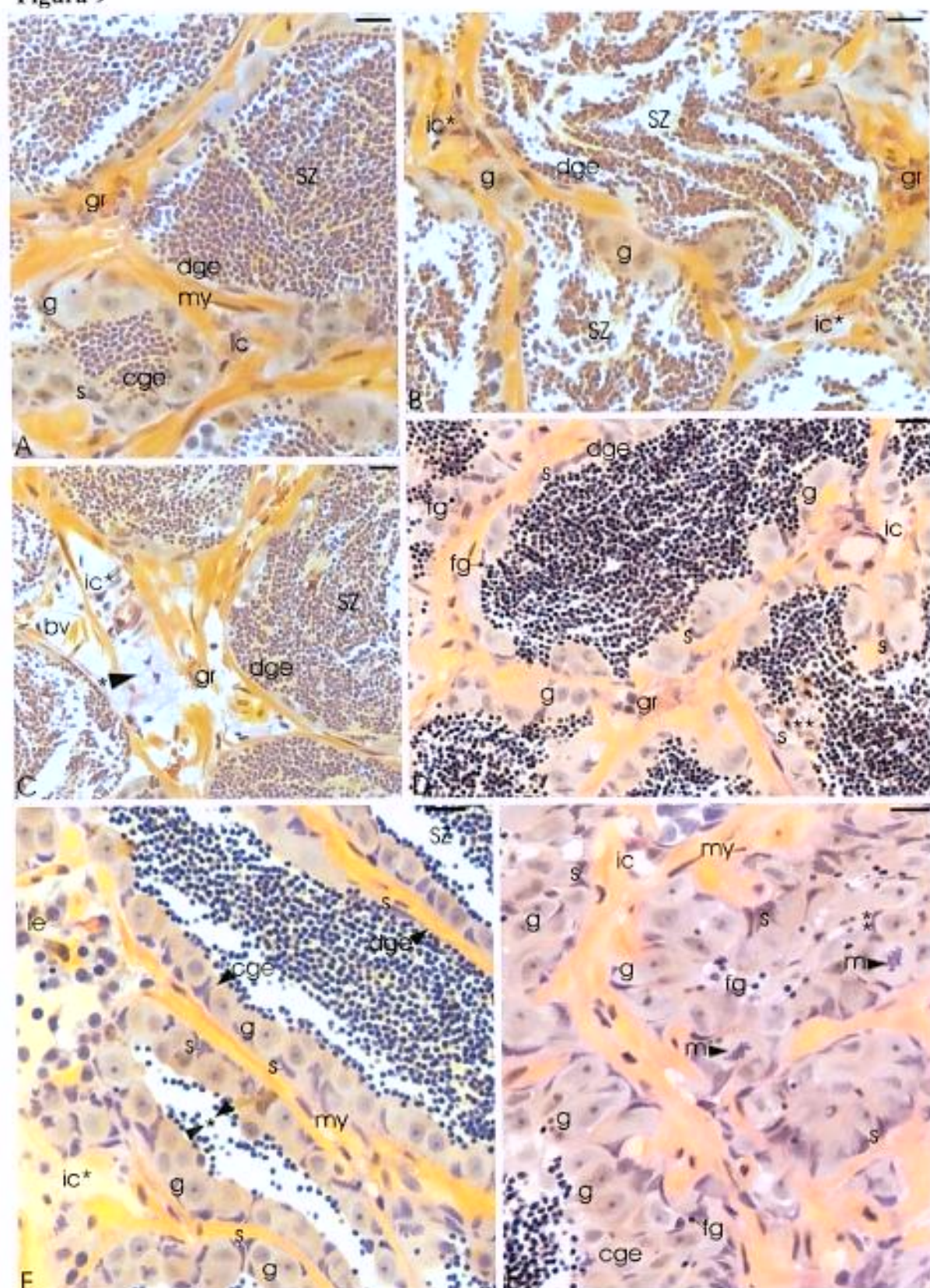
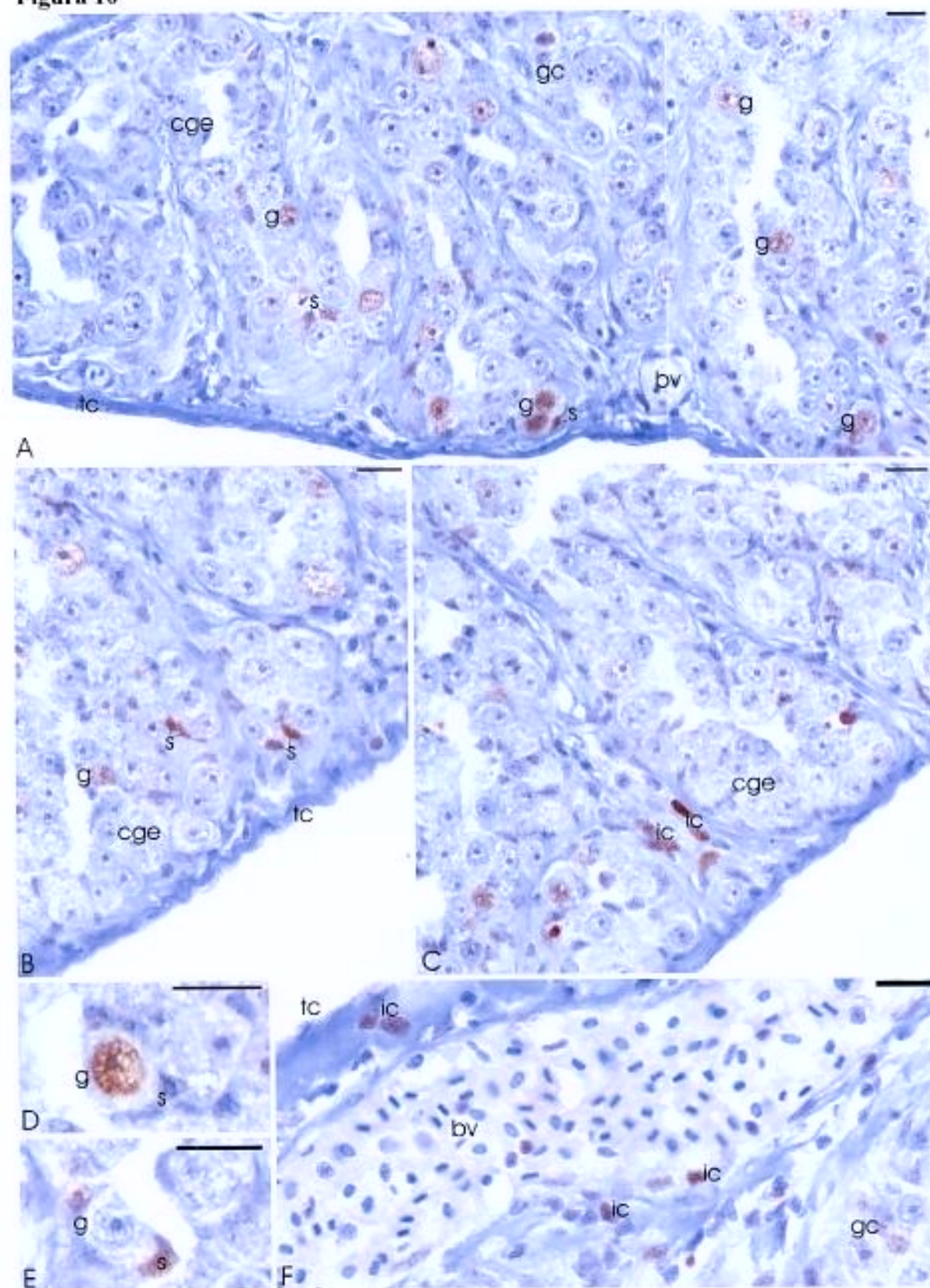


Figura 10. PCNA durante a classe regredida de *P. maculatus*. **A-F:** Cápsula testicular (*tc*); células de Sertoli (*s*); células intersticiais (*ic*); compartimento germinativo (*gc*); epitélio germinativo contínuo (*cge*); espermatogônias (*g*); vaso sanguíneo (*bv*). **D,E:** Notar que a proliferação das células de Sertoli ocorre em geral quando estão associadas a espermatogônias que não estão em processo de divisão. **A-F:** Barra= 10µm.

Figura 10



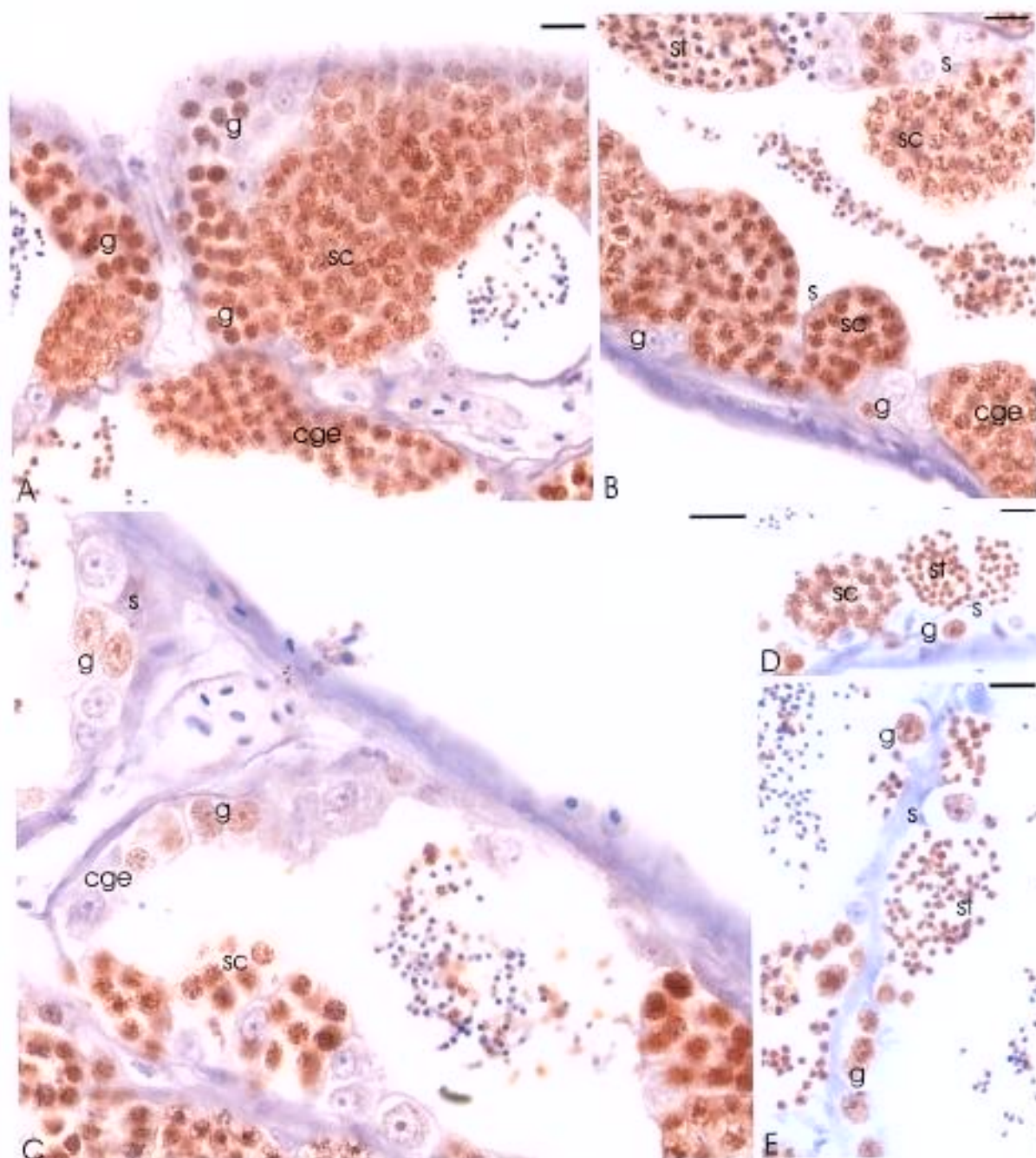


Figura 11. PCNA durante a classe de maturação em *P. maculatus*. A-E: Células de Sertoli (s); epitélio germinativo contínuo (cge); espermatídes (st); espermatócitos (sc); espermatogônias (g). A-E: Barra= 10μm.

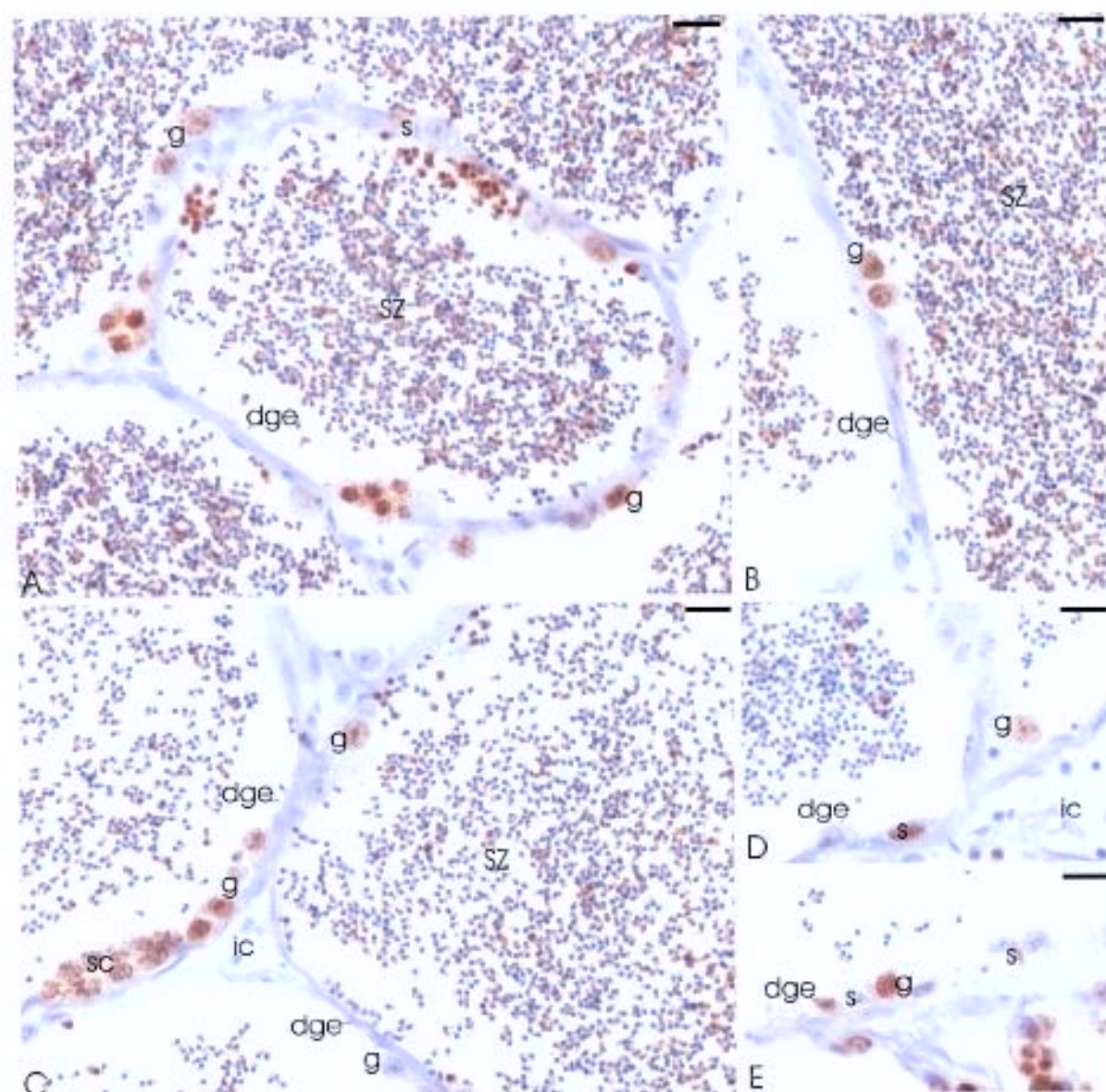


Figura 12. PCNA durante a classe de maturação final em *P. maculatus*. A-E: Células de Sertoli (s); compartimento intersticial (ic); epitélio germinativo descontinuo (dge); espermatócitos (sc); espermatogônias (g); espermatozóides (SZ). A-E: Barra= 10μm.

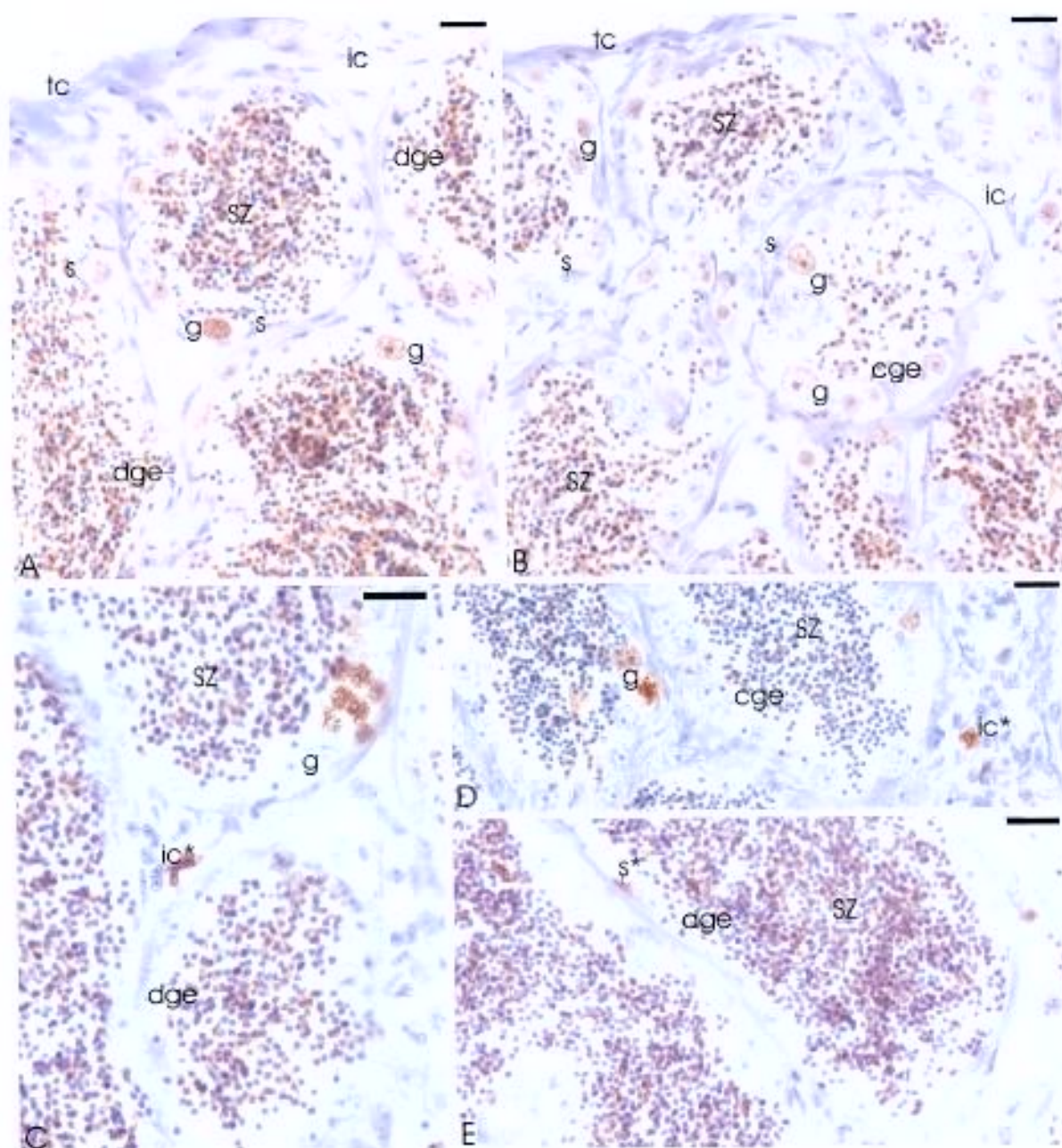


Figura 13. PCNA durante a classe de regressão em *P. maculatus*. A-E: Cápsula testicular (tc); células de Sertoli (s); células intersticiais marcadas com PCNA (ic*), compartimento intersticial (ic); epitélio germinativo contínuo (cge); epitélio germinativo descontínuo (dge); espermatogônias (g); espermatozóides (SZ). A-E: Barra= 10µm.

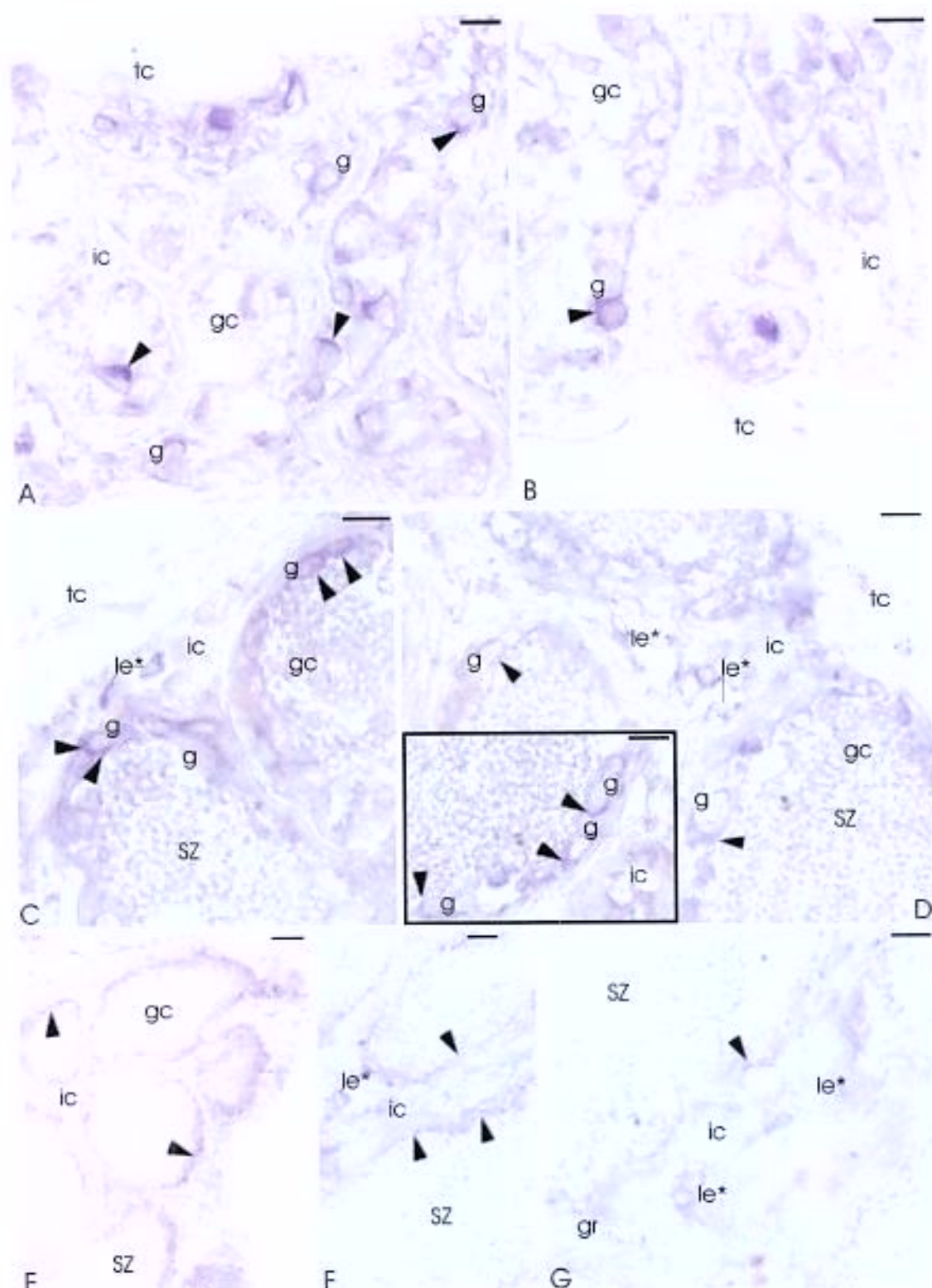


Figura 14. Atividade 3β -HSD. **A-G:** Cápsula testicular (*tc*); células de Leydig (*le**); compartimento germinativo (*gc*); compartimento intersticial (*ic*); espermatogônias (*g*); espermatozoides (*SZ*); granulócitos (*gr*). As *cabeças de setas* mostram marcação enzimática no compartimento germinativo. **A,B:** Regredido; **C,D:** Maturação; **E-G:** Maturação final. **A-D,F,G:** Barra= 10 μ m; **E:** Barra= 30 μ m.

Gráficos

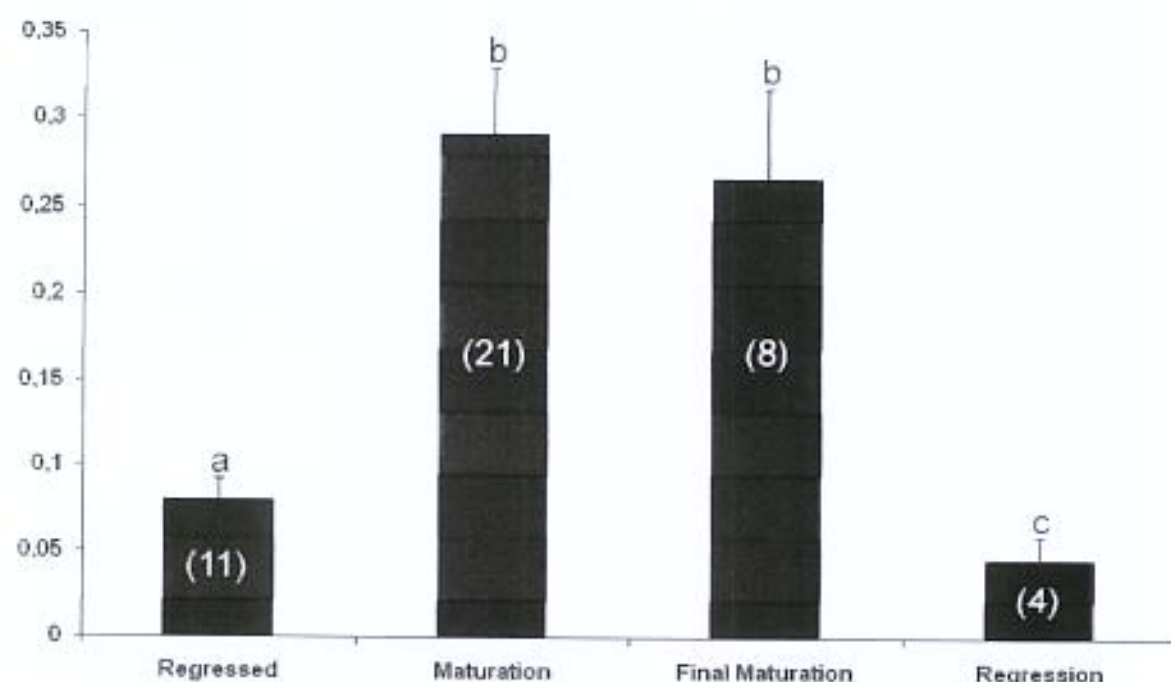


Gráfico 1: Índice gonadosomático (IGS) de cada classe reprodutiva (média $\pm$ erro padrão). Os valores entre parêntesis indicam o número de exemplares amostrados em cada classe reprodutiva. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

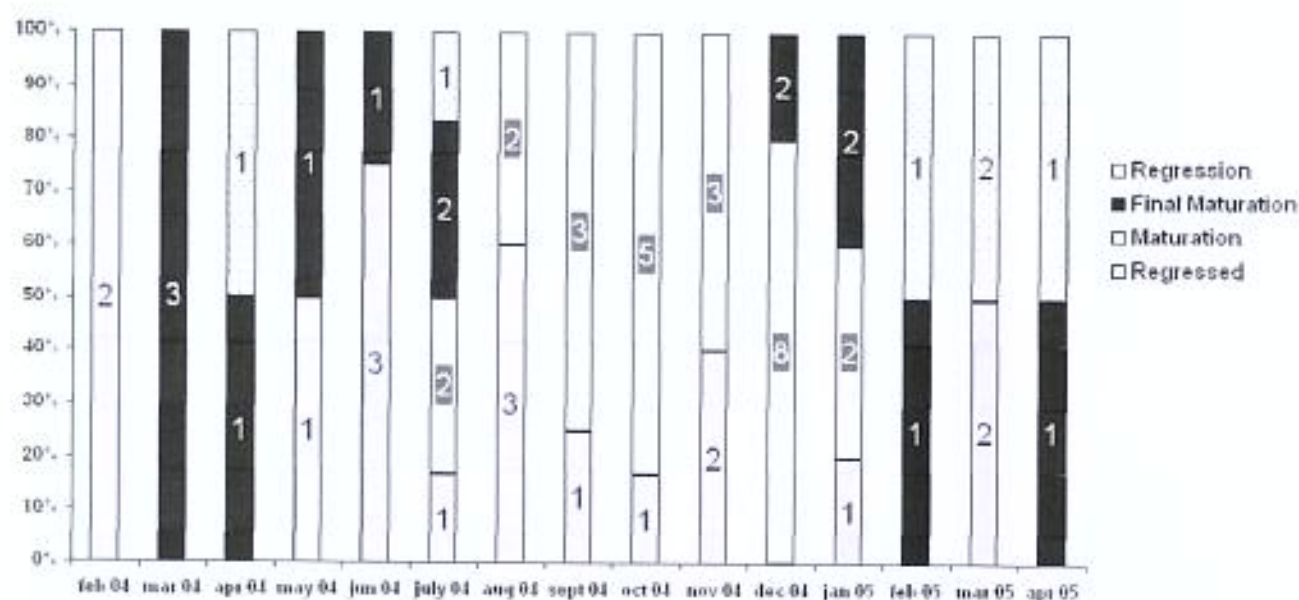


Gráfico 2: Frequência reprodutiva durante o período de estudo. Os valores no interior das barras indicam o número de exemplares de cada classe reprodutiva.

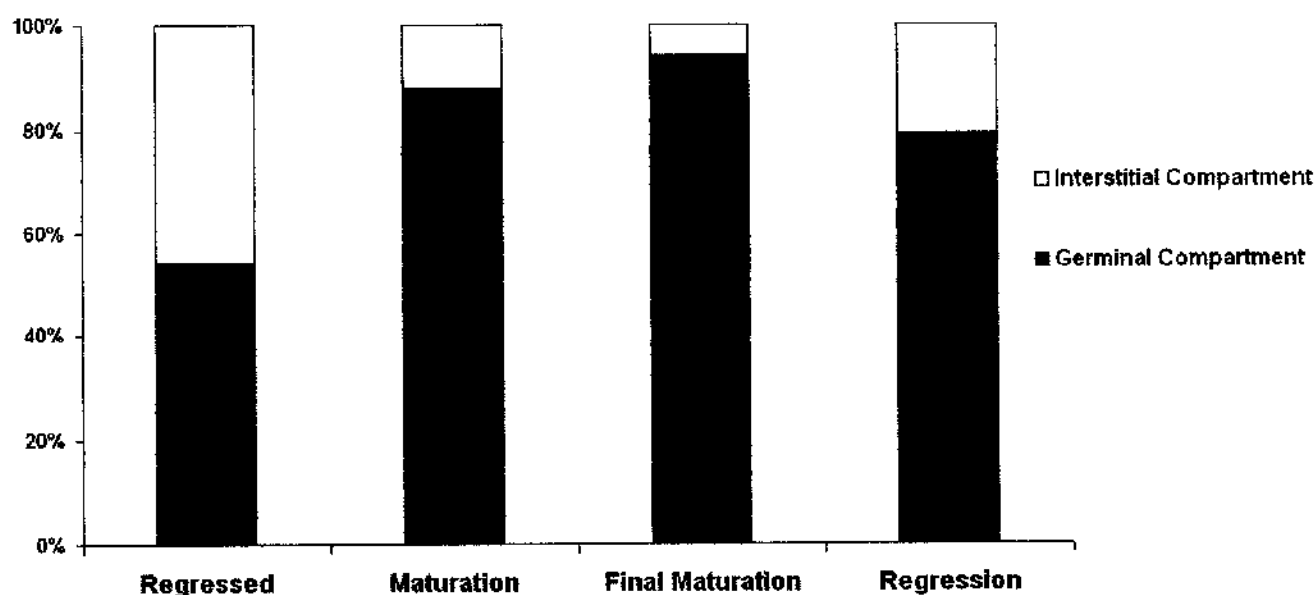


Gráfico 3: Proporção total do compartimento germinativo e do intersticial durante o ciclo reprodutivo de *P. maculatus*.

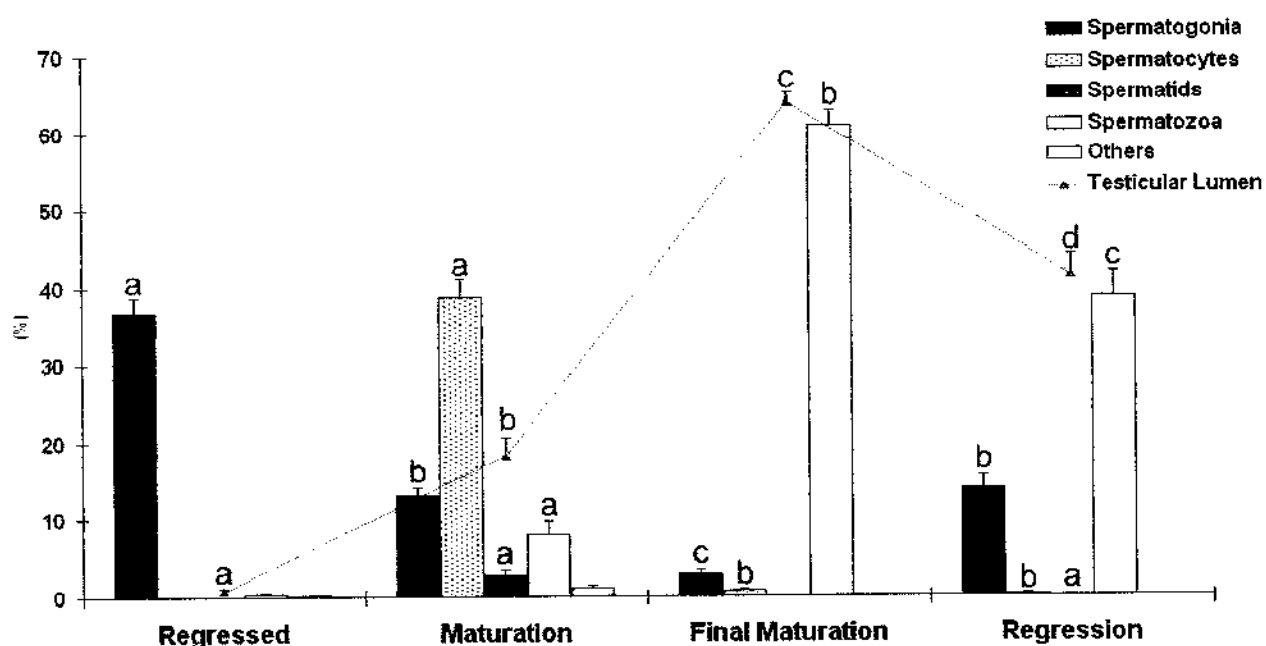


Gráfico 4: Proporção dos tipos de células germinativas em cada classe reprodutiva de *P. maculatus* (média $\pm$ erro padrão). A variação do lúmen testicular também está mostrada. Letras diferentes para cada parâmetro indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

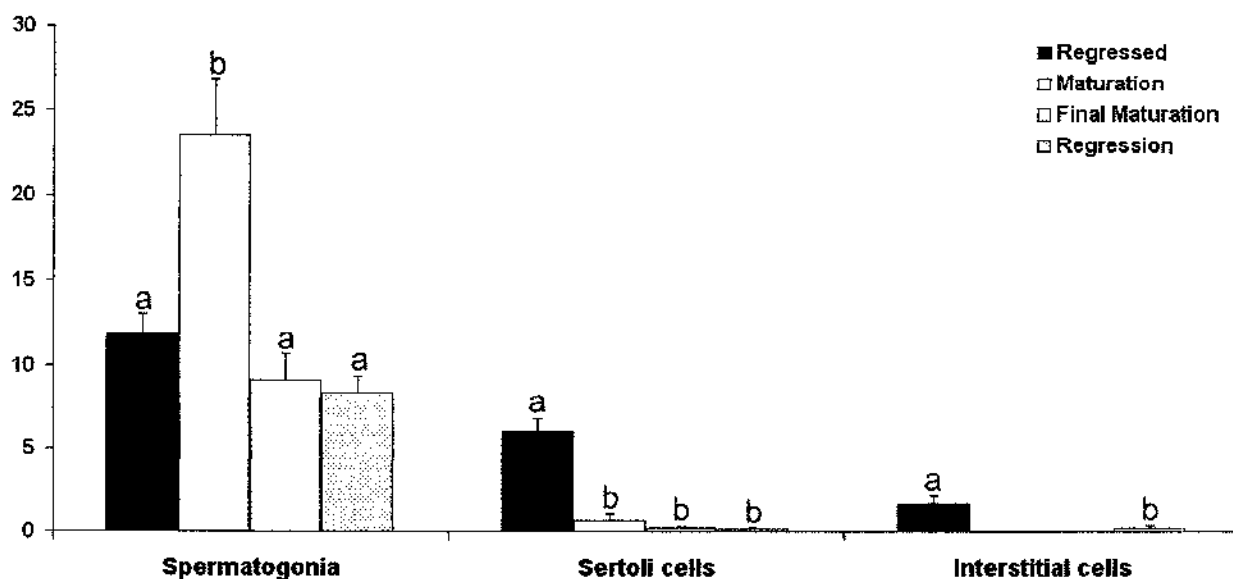


Gráfico 5: Estimativa do número de células em proliferação por área testicular (média $\pm$ erro padrão). Letras diferentes para cada parâmetro indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

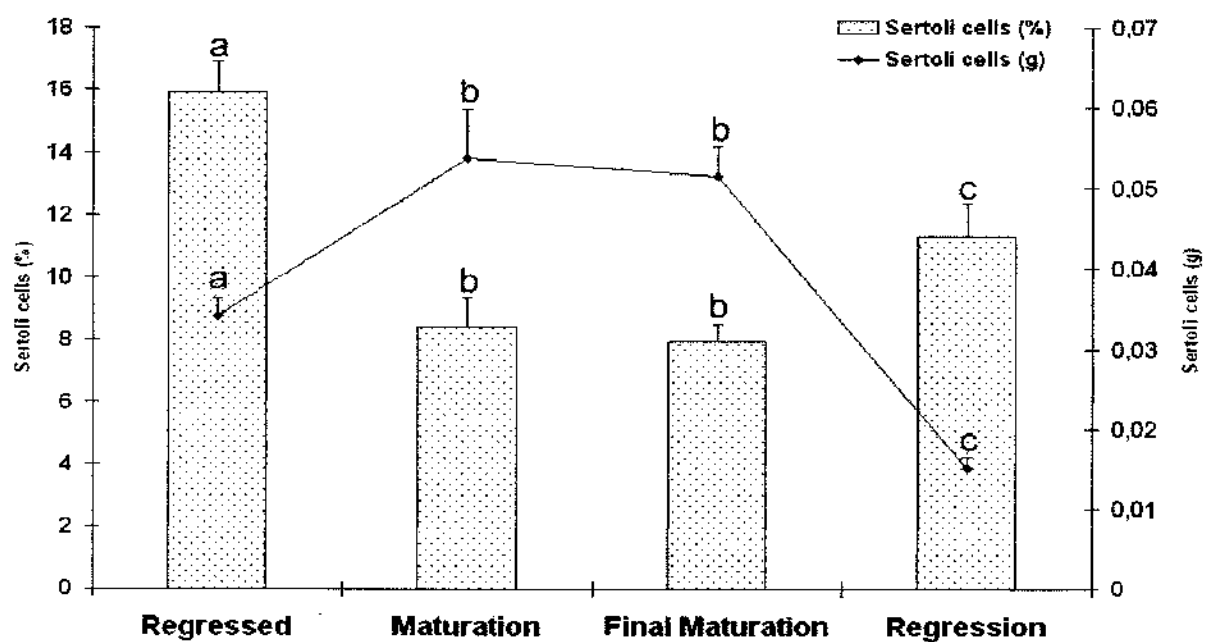


Gráfico 6: Proporção e estimativa da quantidade de células de Sertoli em cada classe reprodutiva (média $\pm$ erro padrão). Letras diferentes para cada parâmetro indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

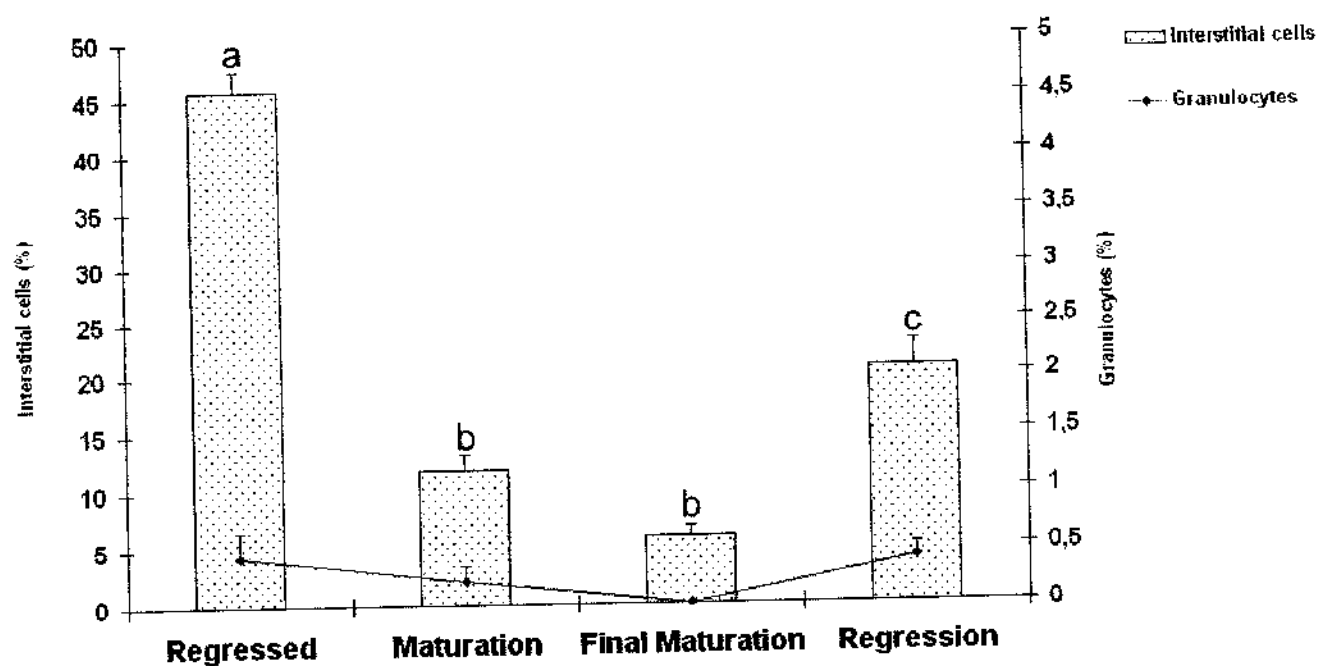


Gráfico 7: Proporção das células intersticiais (células de Leydig, células mióides e outras) e de granulócitos para cada classe reprodutiva (média $\pm$ erro padrão). Letras diferentes para cada parâmetro indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 3

IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS PRODUTORAS DE FSH E LH DURANTE A ESPERMATOGÊNESE CONTÍNUA DE *SERRASALMUS SPILOPLEURA* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) E DESCONTÍNUA DE *PIMELODUS MACULATUS* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE).

Consideração inicial

Nesse capítulo, as células gonadotrópicas de *Serrasalmus spilopleura* e de *Pimelodus maculatus* foram caracterizadas e suas variações em relação ao ciclo reprodutivo contínuo (espermato gênese contínua) de *S. spilopleura* e descontínuo/sazonal (espermato gênese descontínua) de *P. maculatus* foram avaliadas através de imuno-histoquímica, utilizando os anticorpos anti β -LH e anti β -FSH de salmão (gentilmente cedidos pelo Dr. H. Kawauchi, School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Iwate, Japan). Essa metodologia foi realizada no Laboratório de Endocrinologia de Peixes (ICB/USP), sob orientação da Dra. Maria Inês Borella.

Material e Métodos

Machos adultos de *S. spilopleura* e *P. maculatus* foram coletados, mensalmente, no rio Piracicaba (Município de Santa Maria da Serra, Estado de São Paulo, Brasil), durante o período de novembro de 2003 a abril de 2005. Os animais foram anestesiados com 0,1% de benzocaína, pesados, e seus comprimentos mensurados. Em seguida, os animais foram sacrificados por decapitação e seus testículos retirados e pesados para o cálculo do índice gonadossomático ($IGS = [\text{peso das gônadas/peso total do animal}] \times 100$). Para análise do ciclo reprodutivo, animais na mesma faixa de comprimento foram considerados para análise histológica e para o IGS. Os procedimentos adotados estão de acordo com o Comitê de Ética Animal e IBAMA.

Após abertura da caixa craniana, a hipófise foi retirada juntamente com o encéfalo e fixada por 20-24 horas em líquido de Bouin, desidratada, diafanizada e infiltrada em

paraplast segundo técnicas histológicas de rotina. Secções seriadas de 5µm foram obtidas e, após desparafinizados, os cortes foram corados com Tricrômico de Mallory e PAS+Alcian Blue. Para as reações imuno-histoquímicas, as secções histológicas foram processadas de acordo com o método SABC (Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex). O material foi desparafinado, hidratado e submetido ao bloqueio da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tampão PBS (pH 7,6) por 10 minutos. Os cortes foram lavados em tampão PBS e o bloqueio inespecífico foi realizado com 5% de leite em pó desnatado (Molico ®, sem adição extra de Ca⁺²) em tampão PBS por 15 minutos. O material foi incubado por 24 horas à 4°C com os anticorpos primários nas diluições especificadas na Tabela 01. Após incubação, as lâminas foram lavadas em PBS, incubadas com anticorpo secundário biotinilado por 30 minutos, lavadas novamente em PBS e incubadas com o reagente SABC (Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex) por mais 30 minutos. Após lavagem em PBS, o material foi revelado com 0,05% de DAB (3',3'-diaminobenzidina) em tampão PBS contendo 0,03% H₂O₂. As lâminas foram desidratadas, montadas e analisadas em sistema computadorizado de captura de imagens (Pixera). Como controle negativo, algumas lâminas tiveram o anticorpo primário omitido e substituído por PBS.

Tabela 01: Anticorpos primários utilizados na hipófise de *S. spilopleura* e *P. maculatus*.

Anticorpos utilizados	Fonte	Código	Diluição
Chum salmon β-FSH*	Dr. Kawauchi	8510	1:1000
Chum salmon β-LH*	Dr. Kawauchi	8506	1:1000

* Nota: Os anticorpos são monoclonais e foram produzidos em coelhos.

Resultados e Discussão

Hipófise e células gonadotróficas de *S. spilopleura* e *P. maculatus*

As hipófises de *S. spilopleura* e de *P. maculatus* são divididas em duas regiões; a neuro-hipófise e a adeno-hipófise (Fig. 1A,F). A neuro-hipófise é constituída pela *pars nervosa* que penetra e se ramifica no interior da adeno-hipófise (Fig. 1A,F). A adeno-hipófise é subdividida em “*rostral pars distalis*” (RPD), “*proximal pars distalis*” (PPD) e

“*pars intermedia*” (PI), de acordo com as características tintoriais de suas células produtoras de hormônios (Fig. 1A,F). A RPD ocupa a porção mais rostral ou anterior da glândula, envolvendo o pedúnculo hipofisário, logo que este penetra na adeno-hipófise (Fig. 1A,F). A PPD situa-se entre a RPD e a PI, e caracteriza-se por ser mais basófila do que as outras regiões da hipófise (Fig. 1A,F). A PI localiza-se na porção mais caudal ou posterior da glândula e recebe a maior quantidade dos ramos da neuro-hipófise (Fig. 1A,F). Essa distribuição é semelhante à encontrada para vários teleósteos (BALL & BAKER, 1969; PRASADA RAO, 1969; FENERISH, 1975; VAL-SELLA, 1977; RUBAL ET AL., 1984; VAL-SELLA et al., 1986a,b; BORELLA, 1987,1993; GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 1996; VISSIO et al., 1997; PANDOLFI et al., 2001; SHIMIZU et al., 2003; LAIZ-CARRIÓN et al., 2003; GRANDI et al., 2003; CALA et al., 2003; WELTZIEN et al., 2004).

As células gonadotrópicas são as mais abundantes na PPD de *S. spilopleura* e *P. maculatus*. São globosas, com núcleo excêntrico e citoplasma basófilo dotado de vacúolos que variam de acordo com o ciclo reprodutivo (Fig. 1E,H,2B,D,F,3B-F). Quanto à reação histoquímica PAS + Alcian Blue, as células gonadotrópicas de *S. spilopleura* e *P. maculatus* são mais reativas ao PAS do que ao Alcian Blue, o que indica maior conteúdo de polissacarídeos neutros do que ácidos (Fig. 1B,C). Por outro lado, as células tireotrópicas, também basófilas, porém de aspecto fusiforme, reagem mais ao Alcian Blue do que ao PAS (Fig. 1B,C). Essas características também são compartilhadas por outros teleósteos (ver revisão em WELTZIEN et al., 2004). Estudos em microscopia eletrônica de transmissão (VAL-SELLA & SESSO, 1980a,b; KANEKO et al., 1986; QUESADA et al., 1988; PARREIRA, 1998, 2002) revelam que as células gonadotrópicas dos peixes teleósteos possuem citoplasma repleto de grânulos elétron-densos, complexo de Golgi bem desenvolvido e cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso. Os vacúolos documentados na microscopia de luz correspondem às cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso (VAL-SELLA & SESSO, 1980a,b; KANEKO et al., 1986; QUESADA et al., 1988; PARREIRA, 1998, 2002). Esses vacúolos são exclusivos das células gonadotrópicas e estão relacionados com o ciclo reprodutivo (VAL-SELLA &

SESSO, 1980a,b; KANEKO et al., 1986; QUESADA et al., 1988; PARREIRA, 1998, 2002).

As células gonadotrópicas de *S. spilopleura* e *P. maculatus* são imunorreativas aos dois anticorpos utilizados, anti-gonadotropinas de salmão: β -FSH e β -LH (Fig. 1D,G,4,6). Pela imuno-histoquímica, as células gonadotrópicas distribuem-se principalmente na PPD (Fig. 1D,G,4A,B,6A,B), embora em *P. maculatus*, em menor quantidade, e em *S. spilopleura* também podem ser encontradas na PI (Fig. 1G,4A,B), à semelhança de outros teleósteos (CAMBRÉ et al., 1986; GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 1996; VISSIO et al., 1997; SEGURA-NOGUERA et al., 2000; CALA et al., 2003; SHIMIZU et al., 2003). CAMBRÉ e colaboradores (1986) atribuem a localização das células gonadotrópicas na PI como uma projeção da PPD em consequência da grande quantidade de células gonadotrópicas durante a maturação gonadal. As células gonadotrópicas de *S. spilopleura* e *P. maculatus* são mais reativas ao β -LH de salmão do que ao β -FSH de salmão (Fig. 4A,B,6A,B). Com β -FSH de salmão, as secções histológicas apresentam mais reação de fundo (*background*) do que com o anticorpo anti β -LH (Fig. 4A,B,6A,B), apesar das reações terem seguido o mesmo protocolo, e várias diluições dos anticorpos terem sido testadas.

Em *S. spilopleura* e *P. maculatus*, as células do saco vascularizado, órgão vascularizado e de posição caudal à hipófise, também são marcadas com o anticorpo anti β -LH de salmão (Fig. 1D,G). VAL-SELLA e colaboradores (1986a,b) documentam a mesma marcação nas células do saco vascularizado de *Colossoma mitrei* (atual *Piaractus mesopotamicus*) (Characiformes: Characidae) com o anticorpo para LH humano. As funções do saco vascularizado ainda são desconhecidas e a sua possível atividade gonadotrópica, como documentado em *S. spilopleura*, *P. maculatus* e *P. mesopotamicus*, deve ser melhor investigada.

Durante o ciclo reprodutivo de *S. spilopleura* e *P. maculatus*, as células gonadotrópicas apresentam variações quanto ao número (avaliação qualitativa), características tintoriais e quantidade de vacúolos (avaliação qualitativa) (Fig. 2B,D,F,3B-F).

Ciclo reprodutivo contínuo – S. spilopleura

S. spilopleura possui espermatogênese contínua, ou seja, os espermatozóides são produzidos e liberados constantemente durante o ciclo reprodutivo. Os testículos não passam por grandes modificações morfológicas durante o ano, e apresentam todos os tipos de células germinativas em todas as etapas do ciclo. Esta característica define o padrão de IGS denominado no presente trabalho de constante, pois apesar de ocorrerem oscilações do IGS, estas não são estatisticamente significativas, com exceção de alguns picos, caracterizados pelas condições ambientais mais favoráveis e maior quantidade de espermatozóides. Os testículos exibem uma sazonalidade estrutural, definida pela presença de uma região medular (espermatogênica) e uma região cortical (armazenamento de espermatozóides) (Fig. 2A). A região medular possui epitélio germinativo contínuo, isto é, os cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides estão distribuídos por toda extensão da membrana basal. É um epitélio com intensa produção de células germinativas. A região cortical é também espermatogênica, porém tem como principal função o armazenamento de espermatozóides (Fig. 2A). Apresenta epitélio germinativo descontínuo, isto é, trechos de células de Sertoli entremeados a cistos de células germinativas. É um epitélio que deixa de produzir células germinativas e passa a ter função de armazenamento de espermatozóides. Essa morfologia é típica dos exemplares em que o IGS não oscila durante o ciclo reprodutivo (Fig. 2E). Em condições ambientais favoráveis, a região cortical torna-se mais desenvolvida e com maiores extensões de epitélio germinativo descontínuo (Fig. 2C). A função de armazenamento de espermatozóides se sobrepõe à espermatogênese. O lúmen testicular é amplo e repleto de espermatozóides (Fig. 2C), o que se reflete em um IGS elevado (Fig. 2E).

A hipótese foi avaliada em relação aos testículos de animais com IGS estável (como setembro/04, novembro/04, fevereiro/05) e em relação aos testículos de animais com IGS elevado (outubro/04, janeiro/05). No grupo de IGS estável (como novembro/04), a maioria das células gonadotrópicas é globosa, com núcleo excêntrico e citoplasma basófilo (Fig. 2B). Células gonadotrópicas com vacúolos também são observadas, porém em menor quantidade (Fig. 2B). No grupo de animais com IGS elevado (como em outubro/04 e janeiro/05), as células gonadotrópicas contêm aparentemente menor granulação

citoplasmática e são encontradas com diferentes graus de vacuolização (Fig. 2D,F). Células sem vacúolos também estão presentes, porém em menor quantidade (Fig. 2D,F). Qualitativamente, é possível inferir uma correlação positiva entre o IGS e o grau de vacuolização das células gonadotrópicas, e negativa entre o IGS e a concentração de grânulos citoplasmáticos (Fig. 2D-F).

Nos dois grupos de IGS, as células gonadotrópicas exibem marcação semelhante ao anticorpo anti β -LH de salmão (Fig. 4C,E). Entretanto, existe uma relação inversa entre o grau de vacuolização e a marcação imuno-histoquímica, isto é, células com intensa vacuolização aparentemente exibem menor marcação ao anticorpo (Fig. 4E,G-I). A reação limita-se ao citoplasma, e em geral, não ocorre no interior dos vacúolos apesar de poucas granulações marcações no seu interior (Fig. 4E,G-I). A diferença de imunoreatividade entre as células gonadotrópicas também é documentada em outros peixes como *Anguilla anguilla* (Anguilliformes: Anguillidae) (OLIVEREAU & NAGAHAMA, 1983), *Seriola dumerilii* (Perciformes: Carangidae) (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 1996) e *Prochilodus scrofa* (Characiformes: Curimatidae) (PARREIRA, 1998, 2002). Para o anticorpo anti β -FSH de salmão, as células gonadotrópicas mostram-se mais reativas no grupo em que o IGS é elevado (Fig. 4F), comparando-se com o grupo com IGS estável (Fig. 4D).

Os resultados indicam que as células LH de *S. spilopleura* devem atuar tanto na espermatogênese como na liberação dos espermatozóides. Essas conclusões corroboram as tradicionais funções do LH nos peixes teleósteos (ver revisão em SHIMIZU et al., 2003). As células FSH de *S. spilopleura* por estarem repletas de grânulos, devem ser recrutadas a liberar hormônio produzido quando o IGS é elevado, isto é, ao mesmo tempo em que os testículos estão preparados para liberar seus espermatozóides. Em *Fundulus heteroclitus* (Cyprinodontiformes: Fundulidae), as células FSH também possuem maior marcação no período que antecede a liberação dos gametas (SHIMIZU et al., 2003). SHIMIZU e colaboradores (2003) sugerem que o FSH desempenhe função nas etapas finais do desenvolvimento gonadal de *F. heteroclitus*. Por outro lado, em salmonídeos, o FSH atua nas etapas iniciais do desenvolvimento gonadal (NOZAKI et al., 1990 e revisões em SHIMIZU et al., 2003 e WELTZIEN et al., 2004). Em *S. spilopleura*, o FSH poderia desempenhar papel no período que antecede a liberação dos espermatozóides, como

também na proliferação das células de Sertoli, freqüente no epitélio germinativo descontínuo que é característico de IGS elevado (capítulo 1). Nos teleósteos, assim como nos mamíferos, a proliferação das células de Sertoli é dependente do FSH (SCHULZ et al., 2003). Nos peixes teleósteos, o papel do FSH é ainda incerto, embora é possível que seja variável entre os seus diferentes representantes (SHIMIZU et al., 2003; WELTZIEN et al., 2004).

Ciclo reprodutivo sazonal – P. maculatus

P. maculatus apresenta reprodução sazonal (espermatogênese descontínua), isto é, os testículos maturam progressivamente e a liberação dos espermatozóides ocorre somente em uma determinada época do ciclo reprodutivo, em geral, dependente das condições ambientais favoráveis. Nesse modelo, cada etapa do desenvolvimento testicular é caracterizada por uma forma de epitélio germinativo (contínuo ou descontínuo) e por um tipo específico de célula germinativa (Fig. 3A,5). Na classe regredida, o epitélio germinativo é contínuo e formado apenas por cistos de espermatogônias (Fig. 5B). A classe de maturação é caracterizada pelo início da espermatogênese, quando o testículo exibe epitélio germinativo contínuo constituído por cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides (Fig. 5D). A maturação final apresenta epitélio germinativo totalmente descontínuo e lúmen testicular amplo e repleto de espermatozóides (Fig. 5F). A regressão envolve parte da liberação dos espermatozóides e corresponde ao preparo da gônada para o próximo ciclo reprodutivo (Fig. 5H), sendo caracterizada por epitélio descontínuo que gradativamente é repovoado por espermatogônias.

Na classe regredida, as células gonadotrópicas estão distribuídas de forma irregular e em pequena quantidade na PPD de *P. maculatus* (Fig. 3B). Células pouco basófilas também podem ser observadas (Fig. 3B). Na maturação, as células gonadotrópicas mostram-se globosas, com núcleo excêntrico e citoplasma com intensa basofilia (Fig. 3C). Células gonadotrópicas, em diferentes graus de vacuolização, são encontradas próximas à PI de *P. maculatus* (Fig. 3D). Na maturação final, as células gonadotrópicas são pouco basófilas e com alguns vacúolos em seu citoplasma (Fig. 3E). Na regressão, as células gonadotrópicas estão distribuídas de forma irregular e em pequena quantidade (Fig. 3F).

São pequenas e não possuem vacúolos (Fig. 3F). Células pouco basófilas também são observadas nessa região (Fig. 3F).

De um modo geral, e em análise qualitativa; as classes de regressão e regredida possuem poucas células gonadotrópicas ativas; a maturação exibe maior quantidade de células gonadotrópicas vacuolizadas; e a maturação final é caracterizada por células gonadotrópicas pouco basófilas, isto é, que tiveram sua secreção depletada. Esses resultados estão de acordo com as observações histológicas e ultra-estruturais das células gonadotrópicas durante o ciclo dos Siluriformes *Rhamdia hylarri* (Heptapteridae) (VAL-SELLA, 1977; VAL-SELLA & SESSO, 1980a,b) e *Heteropneustes fossilis* (Heteropneustidae) (SUNDARARAJ, 1960); dos Characiformes *Prochilodus scrofa* (Curimatidae) (BORELLA, 1987; PARREIRA, 1998, 2002); dos Salmoniformes *Salmo gairdneri* (atual *Oncorhynchus mykiss*) (Salmonidae) (ROBERTSON & WEXLER, 1962) e *Oncorhynchus nerka* (Salmoniformes: Salmonidae) (VAN OVERBEEKE & MCBRIDE, 1967); dos Perciformes *Tridentiger obscurus* (Gobiidae) (KANEKO et al., 1986); e outros. Nesses estudos, as células gonadotrópicas vacuolizadas ocorrem em maior quantidade durante o estágio maduro (que antecede a liberação dos gametas). Os vacúolos correspondem às cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso (VAL-SELLA, 1977; VAL-SELLA & SESSO, 1980a,b; KANEKO et al., 1986; PARREIRA, 1998, 2002). O significado funcional das cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso permanece ainda desconhecido. Alguns autores sugerem que a dilatação é devido à síntese contínua do hormônio, mas com deficiência no sistema de transporte para o complexo de Golgi (YOUNG & BALL, 1982; PARREIRA, 1998, 2002).

Durante o ciclo de *P. maculatus*, a proliferação espermatogonial e a regressão testicular parecem ser pouco influenciadas pelas células gonadotrópicas, enquanto que a espermatogênese e a liberação dos espermatozoides são extremamente dependentes da atividade gonadotrópica. Essas inferências corroboram os níveis plasmáticos de testosterona (T) e 11ceto-testosterona (11-KT) durante o ciclo reprodutivo sazonal dos teleósteos: baixos durante a regressão e a classe regredida, e elevados durante a maturação e a maturação final (SCOTT & SUMPTER, 1989; GAZOLA & BORELLA, 1997; ROBERTS et al., 1999).

Quanto às reações imuno-histoquímicas, as células gonadotrópicas de *P. maculatus* são mais reativas ao anticorpo anti β -LH de salmão do que ao β -FSH de salmão (Fig. 6A,B). Com o anticorpo anti β -FSH de salmão, a reação de fundo (*background*) é maior do que com β -LH de salmão (Fig. 6A,B). Esta questão pode ser em função da baixa especificidade apresentada por este anticorpo devido às grandes diferenças nas moléculas de FSH nos diferentes grupos de peixes. Os resultados indicam que o FSH e o LH estão presentes durante todo o ciclo de *P. maculatus*. No entanto, a quantidade aparente de células gonadotrópicas varia consideravelmente durante as etapas do desenvolvimento testicular (Fig. 5). Na classe regredida, as células FSH e LH parecem estar em pequena quantidade (Fig. 5A), e aumentam durante a maturação (Fig. 5C) e maturação final (Fig. 5E). A maturação parece ter maior quantidade de células gonadotrópicas em relação à maturação final (Fig. 5C,E). Na regressão, o número de células FSH e LH parece diminuir (Fig. 5G). Os dados obtidos sugerem maior envolvimento das gonadotropinas na espermatogênese (maturação) e na liberação dos espermatozóides (maturação final). As variações das células LH em *P. maculatus* também são documentadas para as células LH de *Salmo gairdneri irideus* (Salmoniformes: Salmonidae) (NOZAKI et al., 1990a,b); *Mugil cephalus* (Perciformes: Mugilidae) (MOUSA & MOUSA, 2000); e *Fundulus heteroclitus* (Cyprinodontiformes: Fundulidae) (SHIMIZU et al., 2003).

Dualidade das células gonadotrópicas de S. spilopleura e P. maculatus: uma ou duas células produtoras de FSH e LH?

Duas formas de gonadotropinas (GTH I e GTH II) foram isoladas da hipófise dos salmonídeos (SUZUKI et al., 1988a,b). GTH I e GTH II são homólogas aos hormônios FSH e LH dos tetrápodes, respectivamente (ver revisão em WELTZIEN et al., 2004). Mais recentemente, o isolamento de duas gonadotropinas, quimicamente distintas, tem sido observado em vários teleósteos (KOIDE et al., 1993; GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 1997; ver revisão em WELTZIEN et al., 2004). Nos teleósteos, a existência de duas gonadotropinas (FSH e LH) é evidente (WELTZIEN et al., 2004) e com diferentes papéis durante o ciclo de vida dos peixes (NOZAKI et al., 1990a,b; SHIMIZU et al., 2003; WELTZIEN et al., 2004). Entretanto, ainda não está claro se uma única célula produz FSH

e LH, como ocorre nos mamíferos, ou se existem dois tipos de células gonadotrópicas; células produtoras de FSH e células produtoras de LH (WELTZIEN et al., 2004). O uso de anticorpos específicos para a subunidade β (β -FSH e β -LH) tem mostrado que o FSH e o LH são sintetizados em células gonadotrópicas diferentes, como documentado nos teleósteos *Salmo gairdneri irideus* (NOZAKI et al., 1990a,b), *Oncorhynchus mykiss* (NAITO et al., 1991), *Xiphophorus maculatus* (KIM et al., 1994), *Alosa sapidissima* (LAIZ-CARRIÓN et al., 2003) e outros. Por outro lado, a existência de uma única célula produtora de gonadotropina também é reportada, como em *Clarias gariepinus* (KOIDE et al., 1992), *Seriola dumerili* (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 1996) e *Odontesthes bonariensis* (VISSIO et al., 1997). Em secções histológicas adjacentes de *S. spilopleura* e *P. maculatus*, o uso de anticorpos anti β -FSH de salmão e β -LH de salmão revela diferentes padrões de imunorreatividade (Fig. 4A,B,6), porém algumas células gonadotrópicas são marcadas com os dois anticorpos ao mesmo tempo (Fig. 4A,B,6). Esse resultado sugere que em *S. spilopleura* e *P. maculatus*, pelo menos uma população de célula gonadotrópica produza tanto FSH como LH. No entanto, mais estudos são necessários para que esta questão seja totalmente esclarecida.

Figura 1. A hipófise e as células gonadotrópicas de *Serrasalmus spilopleura* e *Pimelodus maculatus*. **A-H:** “pars intermedia” (*PI*); “proximal pars distalis” (*PPD*); “rostral pars distalis” (*RPD*); células gonadotrópicas (*GTH*); células tireotrópicas (*TSH*); neuro-hipófise (*NH*); saco vascular (*SV*); vacúolos nas células gonadotrópicas (*cabeças de setas*).

Barra = **A,B,D,F,G** 200µm; **C,H** 40µm; **E** 20µm.

Figura 1

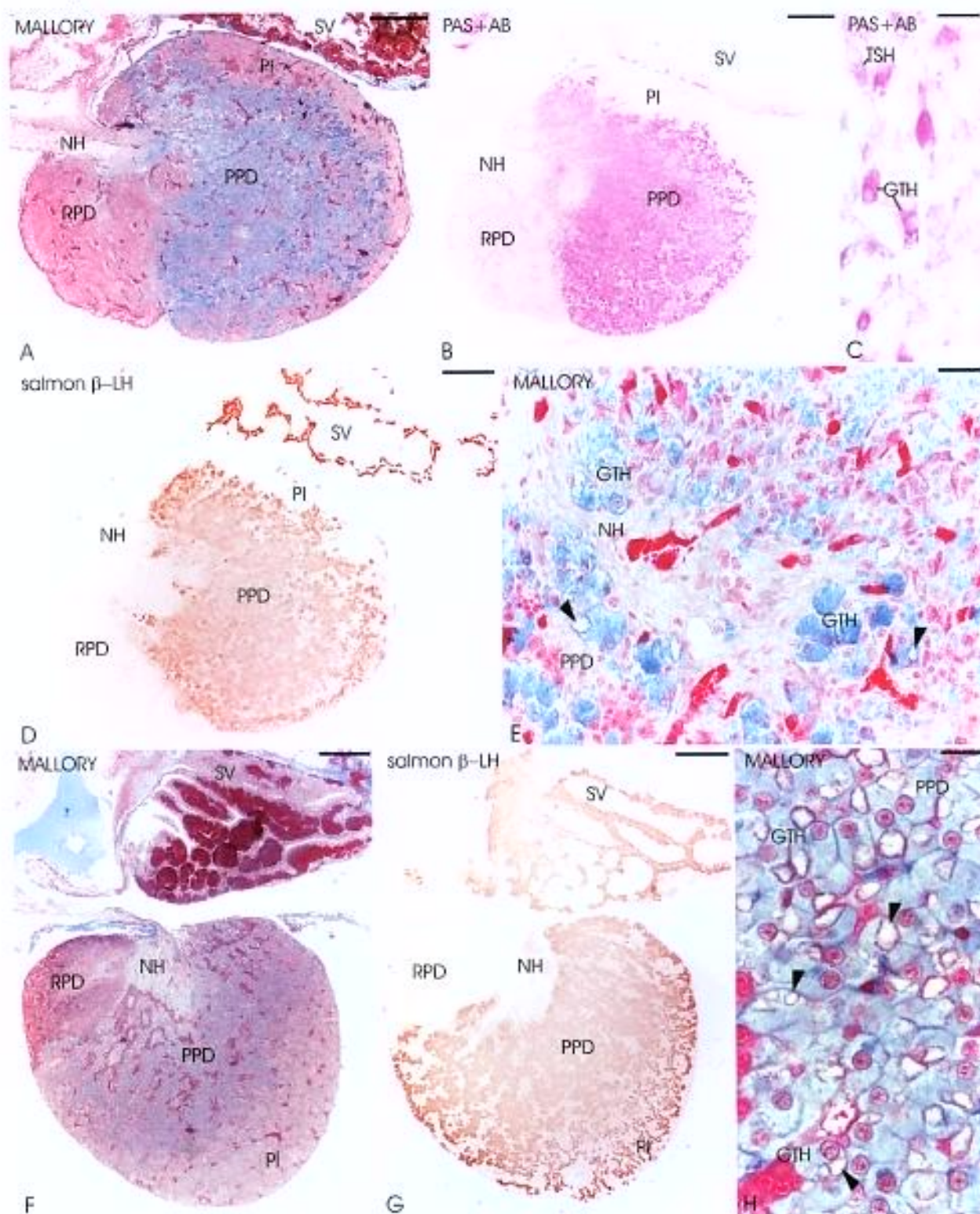


Figura 2. Variação morfológica das células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo contínuo de *S. spilopleura*. **A-F:** “proximal pars distalis” (*PPD*); células gonadotrópicas (*GTH*); células somatotrópicas (*GH*); vacúolos das células gonadotrópicas (*cabeças de setas*). **A,C:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow; **B,D,F:** Tricrômico de Mallory. **E:** Índice Gonadosomático de *S. spilopleura*. Notar correlação positiva entre o IGS e o grau de vacuolização das células gonadotrópicas. *Barra* = **A** 300µm; **B,D,F** 20µm; **C** 200µm.

Figura 2

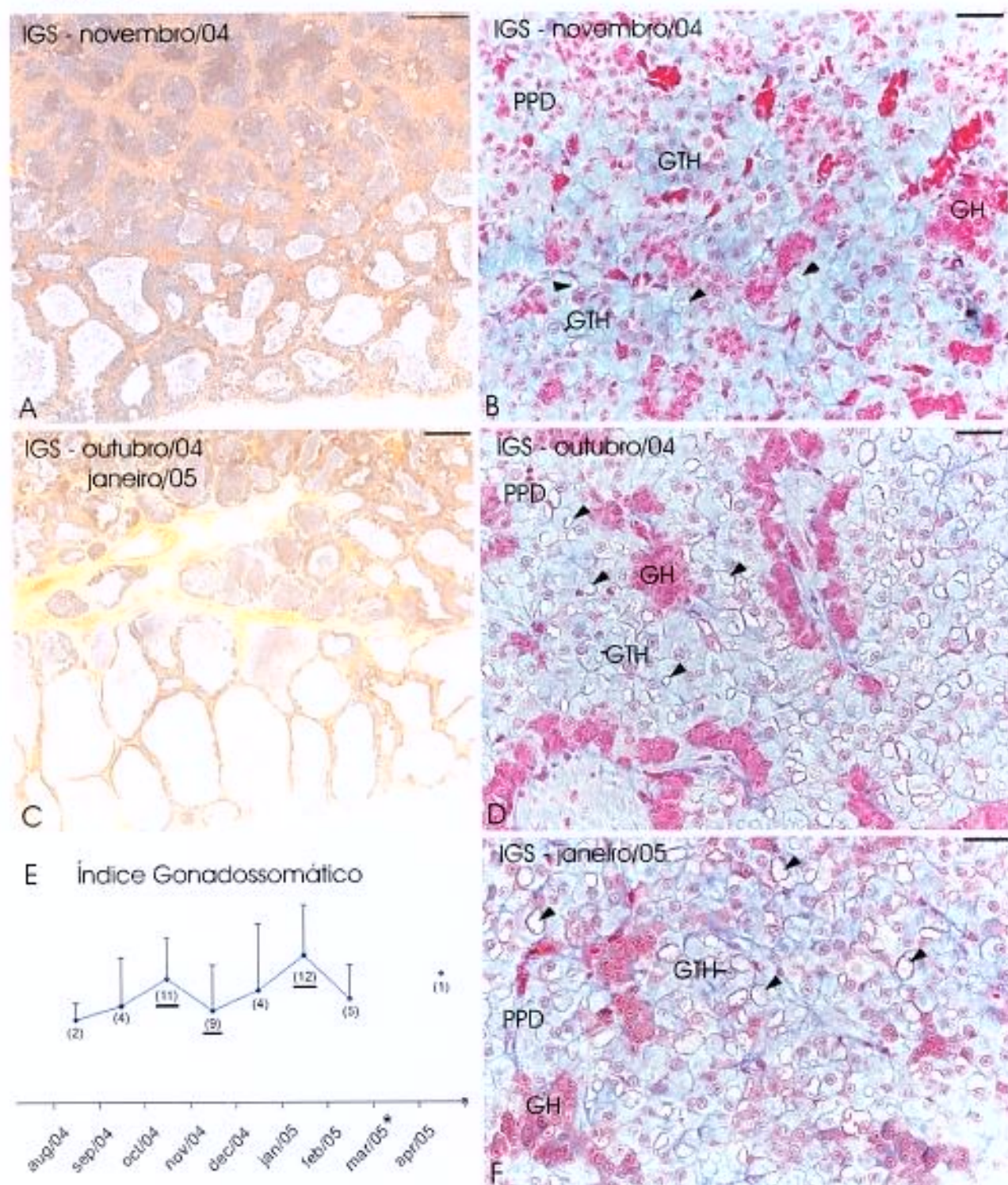


Figura 3. Variação morfológica das células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo sazonal de *P. maculatus*. **A-F:** “pars intermedia” (*PI*); “proximal pars distalis” (*PPD*); células gonadotrópicas (*GTH*); vacúolos das células gonadotrópicas (*cabeças de setas*). **B-F:** Tricrômico de Mallory. **A:** Índice Gonadossomático de *P. maculatus*. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. **E:** Notar células gonadotrópicas com pouca basofilia. *Barra* = **B** 50µm; **C-F** 20µm.

Figura 3

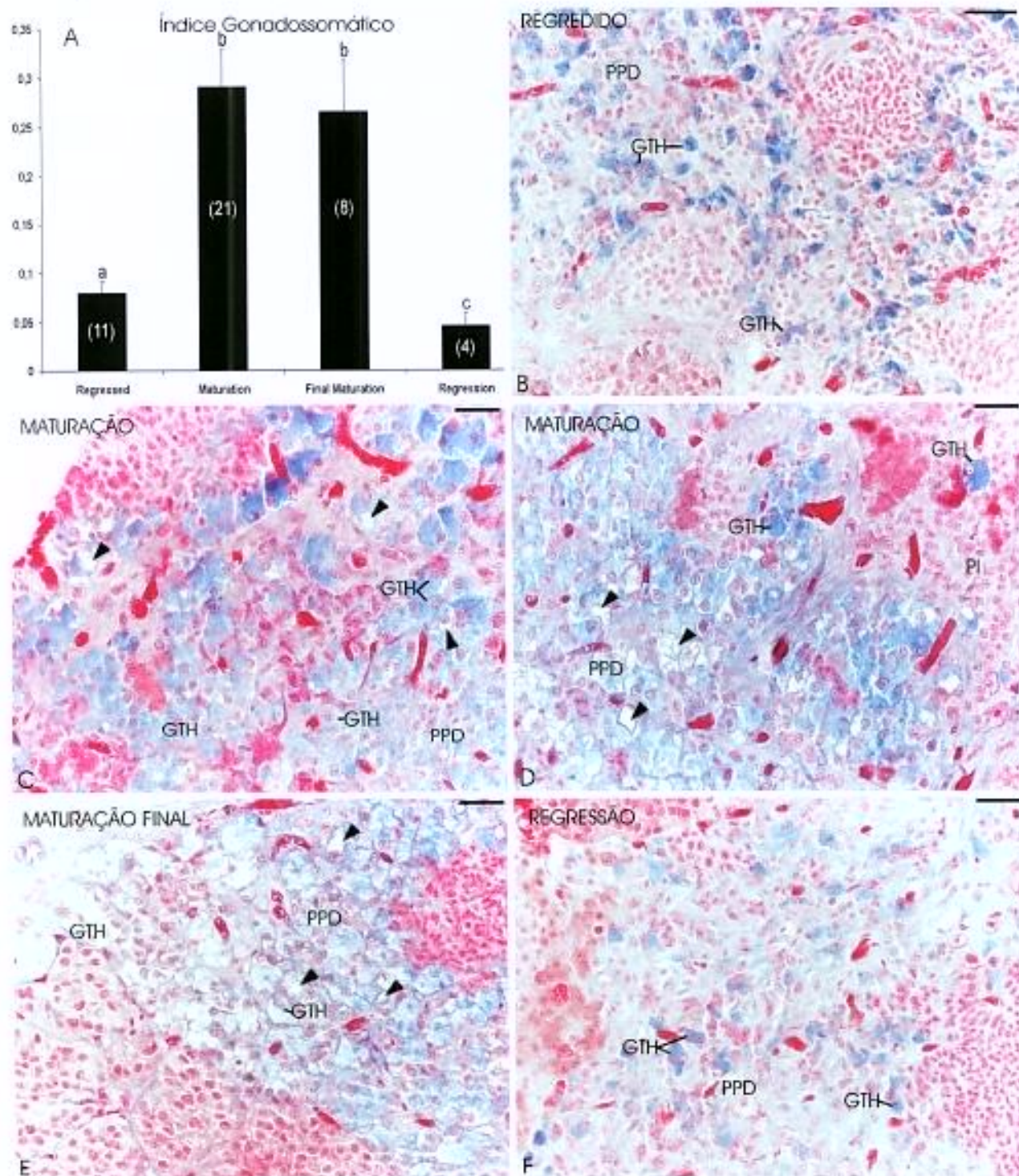


Figura 4. Reações imuno-histoquímicas (β -LH de salmão e β -FSH de salmão) durante o ciclo reprodutivo contínuo de *S. spilopleura*. **A-I:** “pars intermedia” (PI); “proximal pars distalis” (PPD); “rostral pars distalis” (RPD); neuro-hipófise (NH). **A,B:** Secções histológicas adjacentes; **A** com anticorpo anti β -LH de salmão e **B** com anticorpo anti β -FSH de salmão. A *cabeça de seta* indica região de co-localização entre β -LH e β -FSH. Notar que existe um padrão de imunorreatividade diferente entre as duas secções histológicas. **C,D:** Reações imuno-histoquímicas no grupo de animais com IGS constante. **E,F:** Reações imuno-histoquímicas no grupo de animais com IGS elevado. As *cabeças de setas* indicam os vacúolos no interior das células gonadotrópicas. **G-I:** Regiões delimitadas em **E**. Notar relação inversa entre marcação e vacuolização; células vacuolizadas reagem menos ao anticorpo anti β -LH de salmão. *Cabeças de setas* indicam vacúolos nas células gonadotrópicas. Barra = **A,B** 200 μ m; **C-F** 20 μ m; **G-I** 10 μ m.

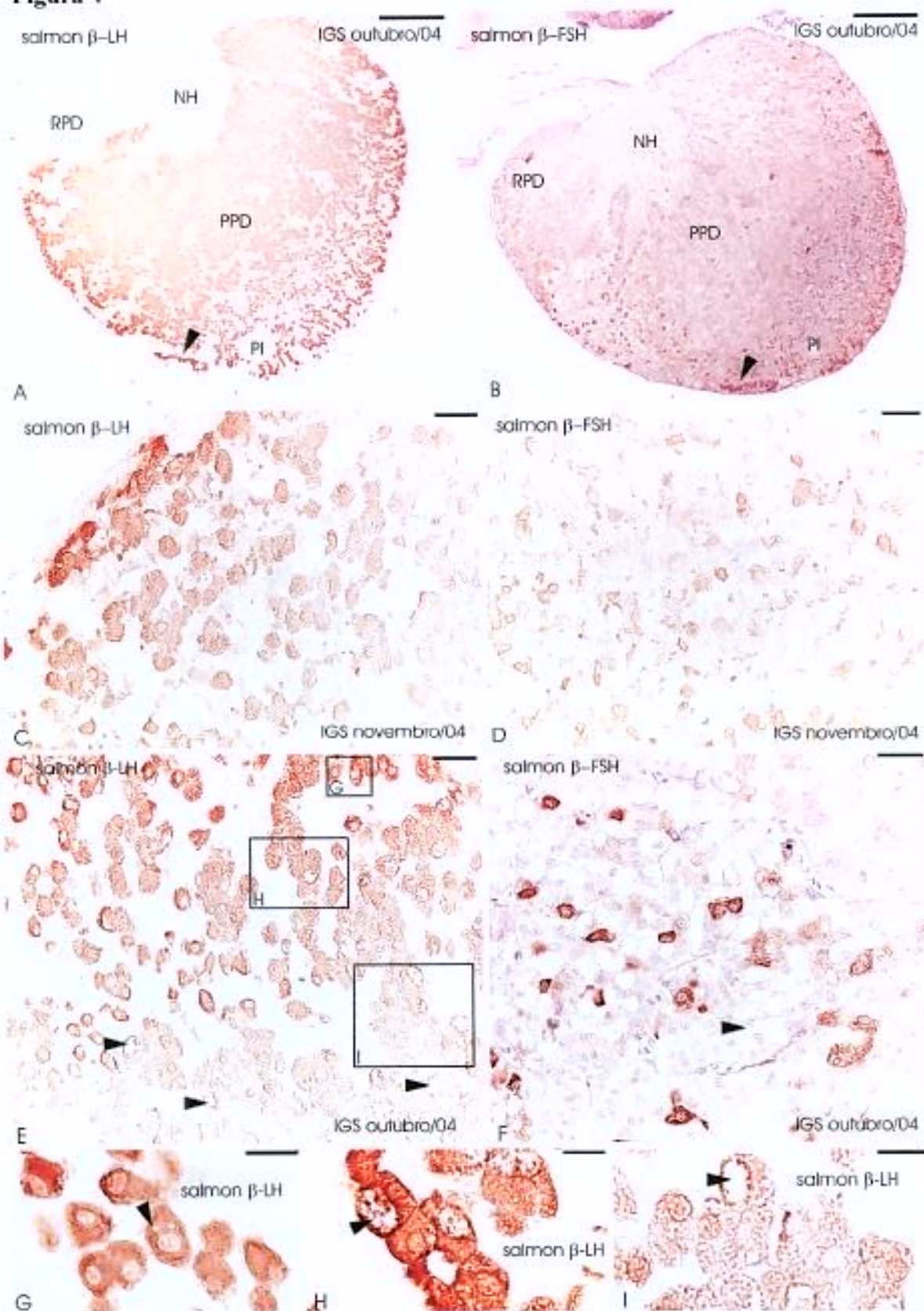
Figura 4

Figura 5. Reações imuno-histoquímicas (β -LH de salmão) durante o ciclo reprodutivo sazonal de *P. maculatus*. **A-H:** “pars intermedia” (PI); “proximal pars distalis” (PPD); “rostral pars distalis” (RPD); epitélio germinativo contínuo (EGC); epitélio germinativo descontínuo (EGD). As células LH estão em pequena quantidade na classe regredida, aumentam durante a maturação e a maturação final; e diminuem na regressão. **A,C,E,G:** Reação imuno-histoquímica com anticorpo anti β -LH de salmão; **B,D,F,H:** PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow. Barra = **A,C,E,G:** 200 μ m; **B,D,F,H:** 50 μ m.

Figura 5

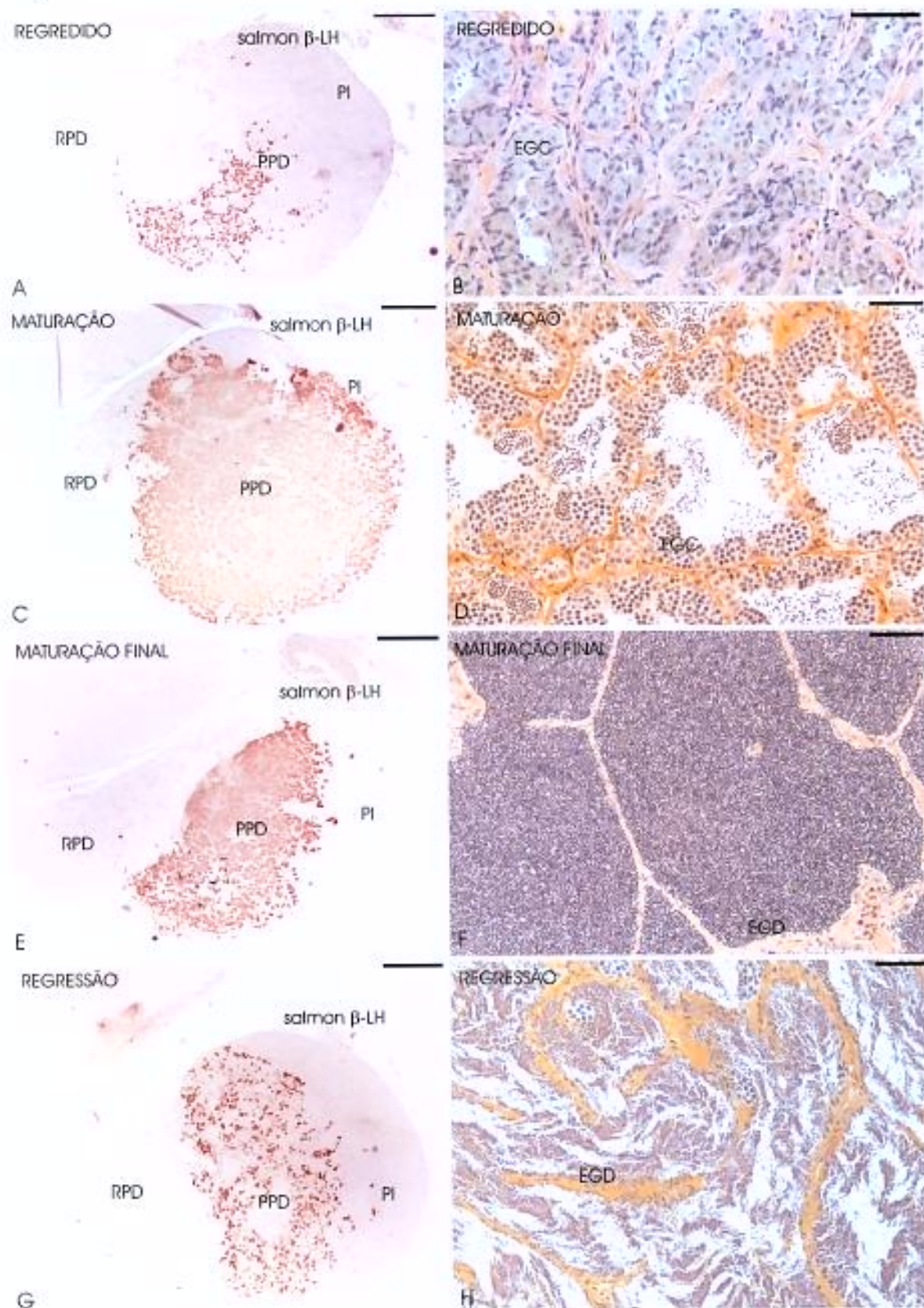
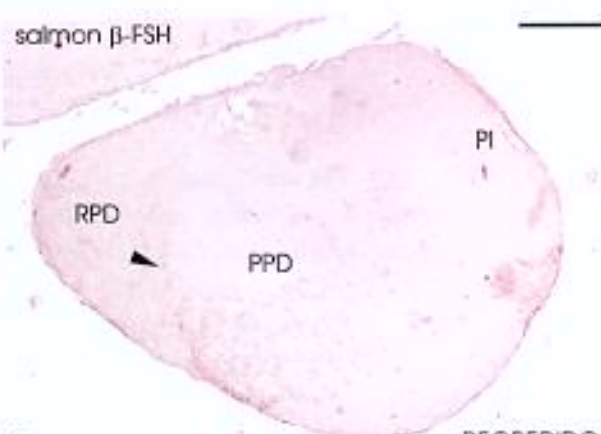
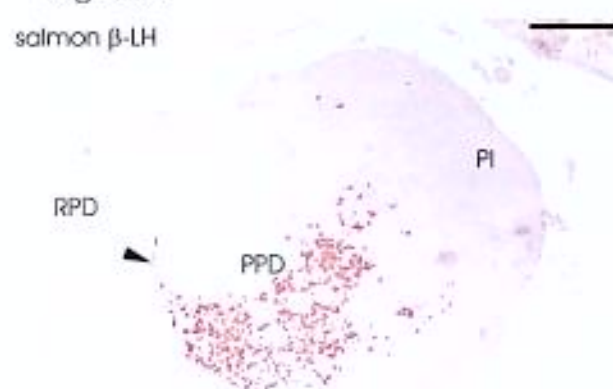
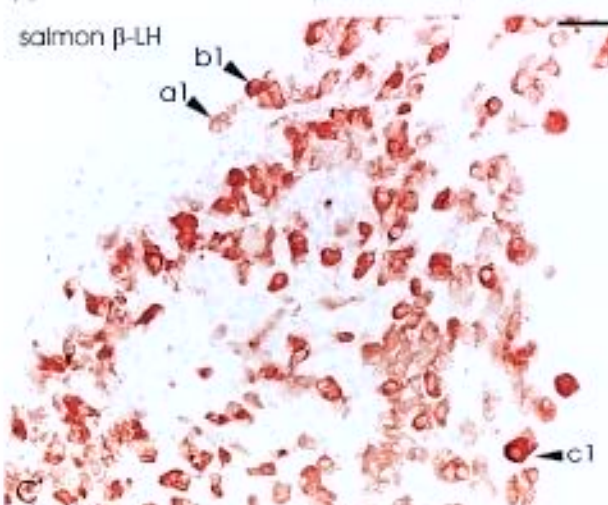


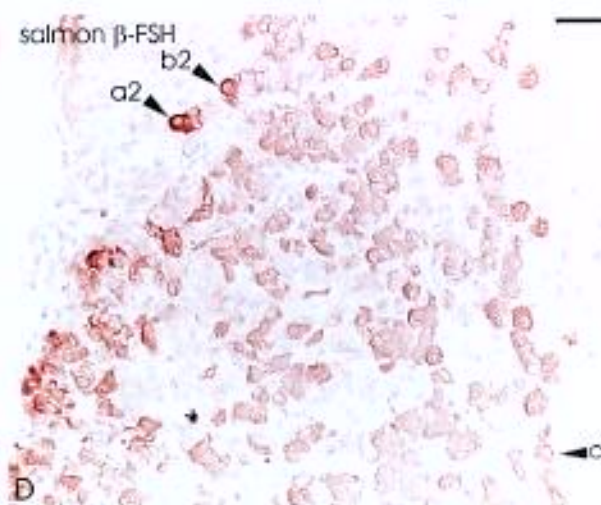
Figura 6. Reações imuno-histoquímicas (β -LH de salmão e β -FSH de salmão) em *P. maculatus*: dualidade das células gonadotrópicas. **A-F:** “pars intermedia” (PI); “proximal pars distalis” (PPD); “rostral pars distalis” (RPD). *Cabeças de setas* indicam co-localização entre β -LH e β -FSH. Notar co-localização entre os grupos *a1-a2*; *b1-b2*; *c1-c2*; *d1-d2*; *e1-e2*. Com o anticorpo anti β -FSH de salmão, as secções histológicas apresentam mais marcação de fundo (*background*) do que com β -LH de salmão. **A,C,E:** Reação imuno-histoquímica com anticorpo β -LH de salmão; **B,D,F:** Reação imuno-histoquímica com anticorpo anti β -FSH de salmão. *Barra* – **A,B:** 200 μ m; **C-F:** 20 μ m.

Figura 6salmon β -LH

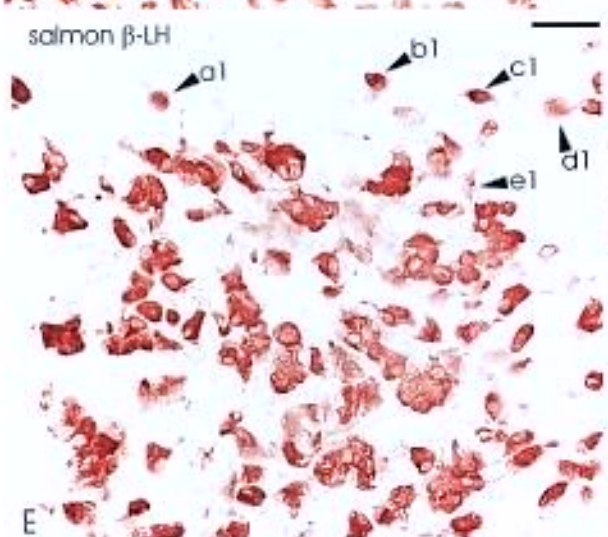
A

salmon β -LH

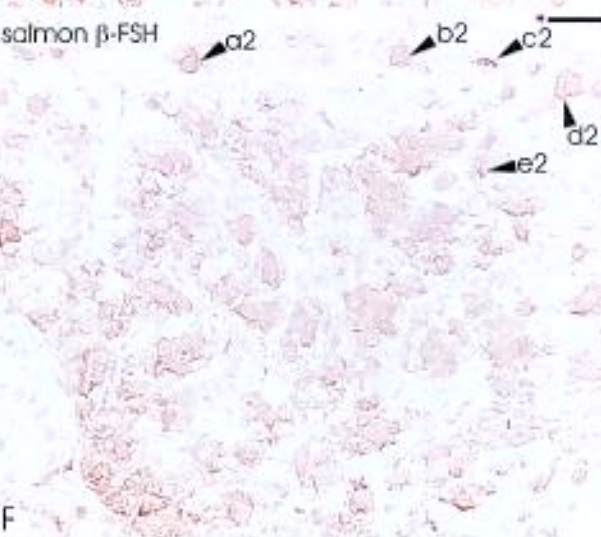
B

salmon β -FSH

C

salmon β -LH

D

salmon β -FSH

E

F

Referências

- BALL, J.N.; BAKER, B.I. The Pituitary Gland: Anatomy and Histophysiology. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. editors. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, volume 2, 1969.
- BORELLA, M.I. **Observações morfológicas e citoquímicas sobre a adenohipófise de curimatã *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. Estudo morfométrico das células gonadotrópicas**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1987.
- BORELLA, M.I. **Caracterização bioquímica parcial e imunocitoquímica do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) no encéfalo e imunocitoquímica dos hormônios gonadotrópicos e do GnRH na hipófise do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Pisces, Teleostei)**. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1993.
- CALA, F.S.; PORTILLO, A.; MARTÍN DEL RÍO, M.P.; MANCERA, J.M. Immunocytochemical characterization of adenohipophyseal cells in the greater weever fish (*Trachinus draco*). **Tissue & Cell**, 35:169-178, 2003.
- CAMBRÉ, M.L.; VERDONCK, W.; OLLEVER, F.; VANDESANDE, F.; BATTEN, T.F.C.; KÜHN, E.R. Immunocytochemical identification and localization of the different cell types in the pituitary of the seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 61:368-375, 1986.
- FENERISH, N.A. **Hipófise de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Teleosteo). Morfologia e variações em relação com o ciclo ovário**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.P.; GARCÍA-AYALA, M.T.E.; AGULLEIRO, B. The adenohipophysis of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810): an immunocytochemical study. **Tissue & Cell**, 28:577-585, 1996.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.P.; KOIDE, Y.; DIAZ, M.V.; KAWAUCHI, H. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 106:389-399, 1997.
- GAZOLA, R.; BORELLA, M.I. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 30(12):1485-1487, 1997.
- GRANDI, G.; COLOMBO, G.; CHICCA, M. Immunocytochemical studies on the pituitary gland of *Anguilla anguilla* L., in relation to early growth stages and diet-induced sex differentiation. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 131:66-76, 2003.
- KANEKO, T.; AIDA, K.; HANYU, I. Ultrastructural changes in the pituitary gonadotropes during the annual reproductive cycle of the female chichibugoby *Tridentiger obscurus*. **Cell Tissue Res.**, 246:137-144, 1986.
- KIM, S.H.; RYU, H.; KANG, C.H.; KIM, S.Z.; SEUL, K.H.; CHO, K.W. Atrial Natriuretic Peptide Immunoreactivity in the Eggs of the Silkworm *Bombyx mori*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 94:151-156, 1994.

- KOIDE, Y.; NOSO, T.; SCHOUTEN, G.; PEUTE, J.; ZANDBERGEN, M.A.; BOGERD, J.; SCHULZ, R.W.; KAWAUCHI, H.; GOOS J.J.TH. Maturational gonadotropin from the African catfish, *Clarias gariepinus*: purification, characterization, localization, and biological activity. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 87:327-341, 1992.
- KOIDE, Y.; ITOH, H.; KAWAUCHI, H. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTHI and GTHII, from bonito (*Katsuwonus pelamis*) pituitary glands. **Int. J. Peptide Protein Res.**, 41:52-65, 1993.
- LAIZ-CARRIÓN, R.; SEGURA-NOGUERA, M.M.; MARTÍN DEL RÍO, M.P.; MANCERA, J.M. Ontogeny of adenohypophyseal cells in the pituitary of the American shad (*Alosa sapidissima*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 132:454-464, 2003.
- LEATHERLAND, J.F.; BALL, J.N.; HYDER, M. Structure and fine structure of the hypophyseal pars distalis in endogenous African species of the genus *Tilapia*. **Cell Tissue Res.**, 149:245-266, 1974.
- MOUSA, M.A.; MOUSA, S.A. Immunocytochemical studies of the gonadotropic cells in the pituitary gland of male mullet, *Mugil cephalus*, during the annual reproductive cycle in both natural habitat and captivity. **J. Appl. Ichthyol.**, 16:98-103, 2000.
- NAITO, N.; HYODO, S.; OKUMOTO, N.; URANAO, A.; NAKAI, Y. Differential production and regulation of gonadotropins (GTHI and GTHII) in the pituitary gland of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. **Cell Tissue Res.**, 266:457-467, 1991.
- NOZAKI, M.; NAITO, N.; SWANSON, P.; MIYATA, K.; NAKAI, Y.; OOTA, Y.; SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 77:348-357, 1990a.
- NOZAKI, M.; NAITO, N.; SWANSON, P.; DICKHOFF, W.W.; NAKAI, Y.; SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 77:358-367, 1990b.
- OLIVEREAU, M.; NAGAHAMA, Y. Immunocytochemistry of gonadotropic cells in the pituitary of some teleost species. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 50:252-260, 1983.
- PANDOLFI, M.; PAZ, D.A.; MAGGESE, C.; RAVAGLIA, M.; VISSIO, P. Ontogeny of immunoreactive somatolactin, prolactin and growth hormone secretory cells in the developing pituitary gland of *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Anat. Embryol.**, 203:461-468, 2001.
- PARREIRA, S.F. Células Gonadotrópicas de curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Pisces, Teleostei). Estudo Ultra-estrutural e Imunohistoquímico. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- PARREIRA, S.F. Estudo Imunocitoquímico e Citoquímico das Células Gonadotrópicas de curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- PRASADA RAO, P.D. A comparative study of the pituitary gland of certain teleosts. **Acta Anat.** 73(2):281-303, 1969.

- QUESADA, J.; LOZANO, M.T.; ORTEGA, A.; AGULLEIRO, B. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of the cell types in the adenohypophysis of *Spaurus aurata* L. (Teleost). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 72:209-225, 1988.
- ROBERTS, S.B.; JACKSON, L.F.; KING, W.; TAYLOR, R.G.; GRIER, H.J.; SULLIVAN, C.V. Annual reproductive cycle of the common snook: endocrine correlates of maturation. **Trans. Amer. Fish Soc.**, 128:436-445, 1999.
- ROBERTSON, O.H.; WEXLER, B.C. Histological changes in the pituitary gland of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) accompanying sexual maturation and spawning. **J. Morphol.**, 110:157-169, 1962.
- RUBAL, E.E.M.; BARACAT, I.; VAL-SELLA, M.V. Morfologia funcional da adenohipófise do cascudo, *Plecostomus albopunctatus* (Val., 1840). **Bol. Fisiol. Anim. S. Paulo**, 8: 119-130, 1984.
- SCHULZ, R.W.; VAN DIJK, W.; BOGERD, J. Sertoli cell proliferation and FSH signaling in african catfish, *Clarias gariepinus*. **Fish Physiol. Biochem.**, 28:223-224, 2003.
- SCOTT, A.P.; SUMPTER, J.P. Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentration of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 73:46-58, 1989.
- SEGURA-NOGUEIRA, M.M.; LAIZ-CARRIÓN, R.; MARTÍN DEL RÍO, M.P.; MANCERA, J.M. Immunocytochemical study of the pituitary gland of the white seabream (*Diplodus sargus*). **Histochem. J.**, 32:733-742, 2000.
- SHIMIZU, A.; TANAKA, H.; KAGAWA, H. Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 132:35-45, 2003.
- SUNDARARAJ, B.I. Correlation between the structure of the pituitary and the changes in the testes of the Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Acta Anat.**, 40:305-322, 1960.
- SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H.; NAGAHAMA, Y. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 71:292-301, 1988a.
- SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H.; NAGAHAMA, Y. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 71:302-306, 1988b.
- VAL-SELLA, M.V. **Hipófise de bagre – *Rhamdia hylarii* Vl. 1840. Estudo da anatomia e histologia da adenohipófise. Morfometria das células gonadotróficas em relação com o ciclo sexual.** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.
- VAL-SELLA, M.V. **Caracterização parcial das células gonadotróficas e da gonadotropina do curimatá (*Prochilodus scrofa* – Steindachner, 1881) no estágio repouso do ciclo gonadal.** Tese de Livre-Docência, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.
- VAL-SELLA, M.V.; SESSO, A. Thin section and freeze fracture studies of the hypophyseal proximal pars distalis in a teleost (*Rhamdia hylarii* Val.), during stages of reproductive cycle. **Cell Tissue Res.**, 208:433-444, 1980a.

- VAL-SELLA, M.V.; SESSO, A. Morphometric evaluation of the number of gonadotrophic cells of the teleost *Rhamdia hilarii* in the maturation, mature and spent stages of the gonadal cycle. **Acta Zool. (Stockholm)** 61:133-139, 1980b.
- VAL-SELLA, M.V.; FAVA-DE-MORAES, F.; BORGES FILHO, O.F.; CASTAGNOLLI, N. Morfologia funcional da adenohipófise e do "saccus vasculosus" do pacu (*Colossoma mitrei*) imaturo. I. A organização estrutural. **Bol. Fisiol. Anim. S. Paulo**, 10:165-175, 1986a.
- VAL-SELLA, M.V.; FAVA-DE-MORAES, F.; BORGES FILHO, O.F.; CASTAGNOLLI, N. Morfologia funcional da adenohipófise e do "saccus vasculosus" do pacu (*Colossoma mitrei*) imaturo. II. A atividade gonadotrópica em variação ambiental. **Bol. Fisiol. Anim. S. Paulo**, 10:155-164, 1986b.
- VAN OVERBEEKE, A.P.; MCBRIDE, J.R. The pituitary gland of the sockeye, *Oncorhynchus nerka*, during sexual maturation and spawning. **J. Fish. Res. Board Can.**, 24:1781-1807, 1967.
- VISSIO, P.G.; SOMOZA, G.M.; MAGGESE, M.C.; PAZ, D.A.; STRÜSSMANN, C.A. Structure and cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Fisheries Sci.**, 63(1): 64-68, 1997.
- WELTZIEN, F.A.; ANDERSSON, E.; ANDERSEN, O.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; NORBERG, B. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). **Comp. Biochem. Physiol.**, A 137:447-477, 2004.
- YOUNG, G.; BALL, J.N. Ultrastructural changes in the adenohipophysis during the ovarian cycle of the viviparous teleost *Poecilia latipinna*. 1. The gonadotrophic cells. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 48:39-59, 1982.

CONCLUSÕES GERAIS

Nossos estudos permitem concluir que:

1. Na espécie *Serrasalmus spilopleura*, de reprodução contínua, o epitélio germinativo organiza-se em estratos; cistos basais de espermatogônias e cistos apicais de células germinativas em desenvolvimento mais avançado. A estratificação é resultado da capacidade das células de Sertoli em formar mais de um tipo de cisto e constitui-se uma estratégia para manter constante a produção de espermatozóides. Em *Pimelodus maculatus*, de reprodução sazonal, quatro etapas são documentadas: regredida, maturação, maturação final e regressão. Na classe regredida, o epitélio germinativo é contínuo e formado apenas por espermatogônias. A maturação caracteriza-se pela predominância de epitélio germinativo contínuo, constituído por cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Na maturação final, o epitélio é totalmente descontínuo, e o lúmen testicular é amplo e repleto de espermatozóides. A regressão envolve a liberação dos espermatozóides e o preparo da gônada para o próximo ciclo. Exibe epitélio germinativo descontínuo que é gradativamente repovoado por espermatogônias.
2. Em relação à atividade proliferativa, em *S. spilopleura*, as espermatogônias se dividem durante todo o ciclo espermatogênico, o que garante a continuidade processo ao longo de todo o período reprodutivo. O rápido *tunover* das espermatogônias também é responsável pela estratificação do epitélio germinativo. As células de Sertoli proliferam quando não formam cistos ou quando em associação a cistos de espermatogônias que não se dividem. A proliferação das células de Sertoli antecede à proliferação espermatogonial, no intuito de garantir o crescimento do cisto e contribuir para o crescimento testicular a cada período reprodutivo. Em *P. maculatus*, a proliferação das espermatogônias é intensa durante a maturação e depois diminui, coincidindo com a exaustão das espermatogônias e conseqüentemente o predomínio do epitélio germinativo descontínuo. Na classe regredida, apesar da grande quantidade de espermatogônias, a atividade proliferativa é baixa e atribuída à divisão das espermatogônias tronco. As células de

Sertoli proliferam em maior frequência na classe regredida, o que contribui para o crescimento do testículo durante o ciclo reprodutivo. Células intersticiais fusiformes também se dividem na classe regredida e são consideradas como precursores das células de Leydig.

3. Quanto à atividade esteroidogênica, em *S. spilopleura*, as células de Leydig da região medular (espermatogênica) têm intensa atividade 3 β -HSD, abundante retículo endoplasmático liso e numerosas mitocôndrias com cristas tubulares. As células de Leydig da região cortical (espermiação) têm baixa atividade 3 β -HSD e características de degeneração como vacuolização citoplasmática, mitocôndrias alteradas, figuras mielínicas e intensa atividade para fosfatase ácida. A espermatogênese é mais dependente dos andrógenos do que o processo de liberação dos espermatozóides. Em *P. maculatus*, a atividade 3 β -HSD é intensa na maturação e na maturação final, e depois diminui na regressão e na classe regredida. Os processos de espermatogênese e liberação de espermatozóides são dependentes de andrógenos.
4. Em *S. spilopleura*, as células produtoras de LH são requeridas durante a espermatogênese e na liberação dos espermatozóides; as células produtoras de FSH são mais ativas na liberação dos espermatozóides (epitélio descontínuo) e provavelmente constitui o estímulo necessário para a proliferação das células de Sertoli. Em *P. maculatus*, a quantidade de células FSH e LH varia consideravelmente em cada etapa do desenvolvimento testicular. As células LH e FSH estão em maior quantidade durante a maturação e a maturação final, e depois diminuem na regressão e na classe regredida. A espermatogênese e a liberação dos espermatozóides são mais dependentes da atividade gonadotrópica do que os processos de proliferação espermatogonial e regressão testicular.