



**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Liziane Amaral Barbosa Gonçalves**

**Caracterização Estrutural e Ultraestrutural das Células do Epitélio Gonadal de**  
***Hypophthalmus Marginatus* (Valenciennes 1840) Durante a Espermatogênese**

**Belém**  
**2014**

**Liziane Amaral Barbosa Gonçalves**

**Caracterização Estrutural e Ultraestrutural das Células do Epitélio Gonadal de *Hypophthalmus Marginatus* (Valenciennes 1840) Durante a Espermatogênese**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Ecologia Aquática e Aquicultura

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rossineide Martins da Rocha.

**Belém  
2014**

**Liziane Amaral Barbosa Gonçalves**

**Caracterização Estrutural e Ultraestrutural das Células do Epitélio Gonadal de *Hypophthalmus Marginatus* (Valenciennes 1840) Durante a Espermatogênese**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Ecologia Aquática e Aquicultura.

Data da aprovação. Belém - PA: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rossineide Martins da Rocha-Orientadora  
Universidade Federal do Pará- UFPA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone do Socorro Damasceno Santos-  
Membro Titular - Universidade Federal do Pará-  
UFPA

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini- Membro Titular -  
Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita  
Filho” - UNESP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira -  
Membro Suplente - Universidade Federal do Pará -  
UFPA

À minha amada  
família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre guiou meus passos e me permitiu vencer mais uma etapa da vida.

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade de dar continuidade à minha formação profissional.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sheila Farhaydes Souza, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pelo empenho no decorrer do curso.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rossineide Martins da Rocha pela orientação competente, apoio, auxílio, conhecimento, amizade e confiança depositada em mim durante este tempo. Receba meus sinceros agradecimentos, muito obrigada por tudo!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira pelo auxílio, sugestões, paciência, conhecimento transmitido e dedicação nos momentos difíceis que necessitei de sua orientação, você sempre estava lá ou melhor, aqui!

Ao Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni pelo apoio e cumplicidade nas coletas de campo em Tucuruí e principalmente por conceder-me a oportunidade de fazer parte do projeto.

Ao Prof. Luciano Queiroz por toda sua colaboração na logística das coletas.

À minha querida família, em especial meus pais Terezinha e Esmaelino Barbosa (in memoria) pela compreensão, carinho e apoio incondicional.

Ao meu querido e amado esposo José Aderson pela paciência, por me trazer alegria e palavras de apoio, sempre que necessitei e me dá a satisfação de fazer parte da minha vida. Te amo!

As minhas irmãs Leida que mesmo longe me fazia sorrir; Lidiane, pelas palavras que por diversas vezes me transmitiram paz; Liliane pelo seu amor fraternal e Livia minha caçula, pelo incentivo e força. Amo Vocês!

Aos meus amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular: Fabrícia Sizo pela amizade, cumplicidade e atenção, és amiga AMADA; Maria Bentes por sua amizade, conhecimentos e auxílios; Carolina Borges, Juliana Molina, Juliana Pantoja e Renata pelas boas conversas; Caroline Montes pelo apoio, sempre disposta a ajudar; Ivana Kerly pela dedicação e paciência; Jean Gomes pelo auxílio com as fotos de microscopia eletrônica de varredura; Leonardo Paixão que estava sempre pronto para transmitir uma palavra de força e perseverança, não poderia esquecer a menina morena que transmite paz em suas palavras, obrigada Karoline Almeida.

Aos amigos do Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia do Desenvolvimento, Yanne Mendes, Breno, Fernando Oliveira e Rodrigo Oliveira por todo auxílio e amizade oferecida sempre.

À grande técnica Lia Sogabe do Laboratório de Técnicas Histológicas pela atenção e auxílio nas confecções das lâminas histológicas.

À grande Fernanda, técnica do laboratório de Biologia Estrutural que disponibilizou várias horas do seu tempo para cortar meus blocos, sua atenção e auxílio nas confecções dos cortes foram determinantes para a construção deste trabalho.

Ao Heyder Coutinho pela atenção e auxílio na captura e revelação das fotomicrografias, obrigada mesmo, sem sua ajuda as características das células não teriam ficado tão “claro”.

Ao amigo Raimundo Oliveira por toda atenção.

Aos professores da banca de qualificação Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Diva Aneli Guimarães e Dr. Ronaldo Borges Barthem pelas sábias contribuições.

Ao meu “amigo da Pós” Rogério Lopes sempre disposto a me ouvir nas inúmeras vezes que precisei, obrigada.

Aos professores da banca de defesa pelas indispensáveis correções e sugestões.

Ao amigo Patrick Hainfellner, pelas inúmeras noites que passamos em claro, trabalhando arduamente. Obrigada, obrigada.

Aos amigos Bruno Nogueira, Thiago Gonçalves e Dione por toda ajuda nas coletas de campo.

À Fundação Amazônica Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Vale do Rio Doce pelo financiamento do projeto Protocolo: 2010/51271-6.

A todos os amigos, colegas, familiares e professores que direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento e principalmente a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

“A vida sem sonhos é  
como um céu sem estrelas”

Augusto Cury

## RESUMO

*Hypophthalmus marginatus* é um siluriforme, pertencente à família Pimelodidae. Na Amazônia oriental esta espécie é altamente consumida, e possui uma grande importância sócio-econômica para a região. Estudo da caracterização histológica do sistema reprodutivo ainda é desconhecido nesta espécie. Portanto, este estudo serve de ferramenta para as técnicas de biotecnologia, necessárias para a produção em cativeiro, visto que a espécie é um dos recursos pesqueiro mais explorado pela pesca artesanal. O objetivo do presente estudo foi estudar aspecto estrutural e ultraestrutural das células do epitélio germinativo de *Hypophthalmus marginatus* durante a espermatogênese. Foram capturados 168 espécimes no período entre dezembro de 2011 a dezembro de 2012. Macroscopicamente foram identificados 69 machos adultos, ainda em campo foi realizada uma incisão ventral e fragmentos da região mediana dos testículos e sêmen foram retirados e submetidos ao processamento e análise em microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Os estudos evidenciaram que as células germinativas se proliferam no interior do cisto espermático de forma sincrônica. As espermátides entram no processo de espermiogênese passando por três fases distintas de diferenciação celular. O núcleo não se move em relação ao eixo flagelar e os centríolos não migram para o núcleo. Os espermatozoides liberados no lúmen do túbulo seminífero apresentaram uma cabeça esférica com o núcleo altamente condensado e sem acrossoma, a peça intermediária curta contendo um único flagelo longo com axonema apresentando o microtúbulo padrão (9+2), a fossa nuclear excêntrica alojava parcialmente o centríolo proximal. A presença de células espermatogênicas na mesma subfase da meiose no interior do cisto é caracterizada como espermatogênese cística, com desenvolvimento sincrônico das células, Isto sugere que espermiogênese de *H. marginatus* seja do tipo III e a presença da fossa nuclear é considerada uma característica distinta para a espécie, o que difere de outros pimelodídeos.

Palavras - chave: Teleósteo. Mapará. Siluriforme. Testículo. Células germinativas.

## ABSTRACT

*Hypophthalmus marginatus* is a siluriforme, belonging to the family Pimelodidae. This species is highly consumed in eastern Amazonia and has a wide socio-economic importance to the region. Studies on the histological characterization of the reproductive system are still unknown in this species. Therefore, this study serves as a tool for biotechnology techniques, necessary for the production in captivity, since this species is one of the fishing resource most intensively exploited by artisanal fisheries. The aim of this study was to characterize the structural and ultrastructural features of germinal epithelium cells of *Hypophthalmus marginatus* during spermatogenesis. 168 specimens were collected from December 2011 to December 2012. Macroscopically were identified 69 adult males. In field, ventral incision was held in fishes and fragments of testicles from the median region and semen were removed. Then the material was subjected to processing and analysis of light microscopy, transmission electron microscopy and scanning. The data revealed that the germ cells proliferate inside the spermatid cyst synchronously. Spermatids enter at the spermiogenesis process through three distinct stages of cell differentiation. The nucleus does not move relative to the axis flagellar and the centrioles don't migrate to the nucleus. The spermatozooids showed a spherical head with the highly condensed nucleus and no acrosome. The intermediary piece was short containing a single long flagellum. The axoneme presents the structure of microtubules within the pattern (9 + 2). The nuclear fossa housed the proximal centriole partially. The presence of spermatogenic cells in the same subphase of meiosis inside the cyst is characterized as cystic spermatogenesis, with synchronous growth of the cells. This suggests that spermiogenesis of *H. marginatus* is of type III and the presence of nuclear fossa is considered a distinctive feature for the species, which differs from other pimelodids.

Key- Words: Teleost. Mapara. Siluriforme. Testicle. Germinative cells.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fotografia 1 - Exemplar adulto de *Hypophthalmus marginatus* (Valenciennes, 1840).....13
- Fotografia 2 - Organização anatômica do testículo de *H. marginatus* e fotomicrografia do túbulo seminífero. **a:** Testículo filiforme (Fi). **b:** Secção transversal do túbulo seminífero ilustrando anastomose tubular (pontilhado preto). **c:** Cistos germinativos em diferentes fases espermatogênicas: espermatogônias secundárias (SGB), espermatócito (SC), espermatídes (S) e espermatozóides (Z) livres no lúmen indicando espermatogênese cística. **d:** Secção transversal do túbulo seminífero ilustrando espermatogônias primárias (SGA) no epitélio germinativo. **e:** Compartimento intersticial (IC) com Células de Leydig (Le) e túbulo seminífero (T) (pontilhado branco). (D) Ducto espermático. (Seta) Sinuosidade. Coloração: **(b,d)** Hematoxilina+Eosina; **(c,e)** Azul de Toluidina.....28
- Fotografia 3 - Fotomicrografia da espermatogênese de *H. marginatus*. Fase mitótica **a-c:** Espermatogônia primária (SGA) com núcleo arredondado. Espermatogônia secundária (SGB) de tamanho menor e núcleo de 2 a 3 nucléolos. Fase meiótica **d-g:** Espermatócito primário (SCI) Leptóteno (Le); Zigóteno (Zi); Paquíteno (P); Diplóteno (D); Diacinese (Di); Metáfase I (MI); Anáfase I (A). **h:** Espermatócito secundário (SCII). Fase espermiogênica. **i-l:** Espermátide inicial (S1); Espermátides intermediária (S2); Espermátide final (S3); Espermatozóides (z) livres no lúmen. Células de Sertoli (Se) envolvendo as células espermatogênicas. Coloração: Azul de Toluidina.....33
- Fotografia 4 - Eletromicrografia das células espermatogênicas de *H. marginatus*. **a:** Espermatogônia primária (SGA) com citoplasma ocupado por mitocôndria (m) associada a nuage; retículo endoplasmático liso (cabeça de seta); núcleo arredondado (N) e um nucléolo visível (Nu). **b:** Espermatogônia secundária (SGB) com núcleo formado por cromatina condensada próxima a membrana nuclear e mitocôndrias organizadas em um pólo da célula. Junção celular (seta branca) entre SGB e célula de Sertoli (Se). Inset: Zônula de adesão entre células. **c-f:** Espermatócito primário (SCI) - Leptóteno (Le) redução de citoplasma e cromatina nuclear condensada; Zigóteno (Zi) - presença do complexo sinaptonêmico próximo a membrana nuclear; Paquíteno (P) - vários complexos sinaptonêmicos bem desenvolvidos. Diplóteno (D) - organização de aglomerado de cromatina próximo à membrana nuclear; Diacinese (Di) - perda da membrana nuclear e cromatina espessa; Metáfase (MI) - cromatina localizada na porção mediana da célula. G: Espermatócito secundário (SCII), núcleo volumoso com citoplasma delgado apresentando centríolo (c), vesícula (v) e mitocôndrias (m). Inset **(b):** Barra de escala =2µm.....34

Fotografia 5 - Eletromicrografia da espermiogênese de *H. marginatus*. **a:** Espermátide inicial (S1), interligadas com pontes citoplasmáticas (seta preta). **b:** Espermátides intermediária (S2), presença de uma fossa nuclear (pontilhado) com centríolos proximal (P) e distal (D). **c:** Secção transversal de uma peça intermediárias com mitocôndrias (M). **d:** Secção transversal da peça intermediária ilustrando núcleo central (N), mitocôndrias e vesículas (v) ao seu redor. **e:** Espermátide final (S3) secção longitudinal ilustrando núcleo arredondado e volumoso circundado por uma fina camada de citoplasma, peça intermediária com centríolos proximal (P) e distal (D) e peça principal (PP) definida. **f-g:** Espermatozóides com cabeça (H) esférica e membrana de superfície irregular (seta branca), peça intermediária (MP) e peça principal (PP). **h:** Secção transversal da peça principal do flagelo (f). **I:** Secção transversal da peça terminal do flagelo mostrando somente microtúbulos periféricos.....35

Fotografia 6 - Microscopia eletrônica de varredura do túbulo seminífero de *H. marginatus*. **a:** Cisto germinativo íntegro (pontilhado) com superfície irregular. **b:** Cisto em rompimento liberando espermatozóides. **c:** Cistos germinativos íntegros (pontilhados) e espermatozóides (Z). **d-e:** Lúmen (L) do túbulo seminífero ilustrando grande quantidade de espermatozóide livres. **f-g:** Detalhe do espermatozóide extraído do sêmen ilustrando cabeça arredondada (h), peça intermediária (MP) e Peça principal (PP).....36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 GERAL.....	14
2.2 ESPECÍFICOS.....	14
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
3.1 ESTRUTURA TESTICULAR.....	15
3.2 ESPERMATOGÊNESE.....	15
<b>3.2.1 Características das células germinativas.....</b>	<b>16</b>
3.3 ESPERMIOGÊNESE.....	17
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>20</b>
<b>4. ARTIGO - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS GERMINATIVAS DE <i>HYPOPHthalmus marginatus</i> (VALENCIENNES 1840) DURANTE A ESPERMATOGÊNESE.....</b>	<b>24</b>
RESUMO	
ABSTRAT	
INTRODUÇÃO	
MATERIAL E MÉTODOS	
RESULTADOS	
CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os siluriformes constituem um grupo de peixes com uma enorme diversidade ecológica, representados por 3.088 espécies e 36 famílias, a maioria dulcícola. O gênero *Hipophthalmus* representado na Amazônia por três espécies: *H. edentatus* (Spix, 1929), *H. fimbriatus* (Kner, 1857) e *H. marginatus* (Valenciennes, 1840), pertence à ordem siluriforme da família Pimelodidae apresentam hábitos pelágicos e zooplanctófago (CARVALHO; GOULDING, 1985; TEUGELS, 1996; FERRARIS, 2007). A espécie *H. marginatus* (Figura 1) apresenta comportamento reofílico e forma cardumes no mês de novembro, com desova nos meses de janeiro e fevereiro (CARVALHO; MÉRONA, 1986).

O *H. marginatus*, conhecido vulgarmente como mapará, é o peixe de maior desembarque, apresenta grande importância econômica, pois corresponde entre 20% a 45% do total da produção pesqueira (SANTOS et al., 2004; ALVES; BARTHEM, 2008; COSTA; OSHIRO; SILVA, 2010). Por ser uma espécie intensamente explorada, já se observa a redução em seus estoques pesqueiros (CINTRA et al., 2011). Apesar da grande importância econômica do mapará estudos a cerca das características histológicas do sistema reprodutivo masculino ainda são desconhecidos. Desta forma, torna-se necessário conhecer os aspectos básicos da espermatogênese desta espécie, que visem colaborar para estudos filogenéticos entre as diferentes famílias de Siluriformes, bem como auxiliar nas práticas de biotecnologia necessárias para a produção em cativeiro, para o manejo sustentável e sua conservação, visto que esta espécie é um dos recursos pesqueiro mais explorado pela pesca artesanal. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar as células germinativas e espermatozoides de *Hypophthalmus marginatus* durante a espermatogênese.

Figura 1 - Exemplar adulto de *Hypophthalmus marginatus*.



Fonte: Liziane Gonçalves, 2012.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Estudar aspecto estrutural e ultraestrutural das células do epitélio germinativo *Hypophthalmus marginatus* (Valenciennes, 1840) durante a espermatogênese.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar o tipo de espermatogênese de *Hypophthalmus marginatus*;
- Descrever aspectos estruturais e ultraestruturais das células germinativas de *Hypophthalmus marginatus*;
- Caracterizar a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides;
- Descrever a morfologia das células de Sertoli.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ESTRUTURA TESTICULAR

Os Siluriformes apresentam uma grande variedade nas características morfológicas das gônadas masculinas, podendo apresentar testículos digitiformes ou franjados, com vesículas seminais acessórias na região caudal, ou ainda testículos com lóbulos dobrados (SANTOS et al., 2001; LOPES et al. 2004; GUIMARÃES-CRUZ; SANTOS, 2004; BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006; BARROS et al., 2007; SANTOS et al., 2010; MELO et al., 2011; SANTOS et al., 2014). Os testículos da maioria dos teleósteos normalmente são órgãos pares, colados na parte posterior da cavidade abdominal através do mesórquio, unidos na extremidade caudal para formar um pequeno ducto espermático (HIBIYA, 1982).

Histologicamente, os testículos encontram-se revestidos por uma túnica albugínea que envia septos para interior do órgão, delimitando os lóbulos ou túbulos seminíferos (GRIER, 1981; BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006). Estudos realizados sobre a estrutura testicular de peixes teleósteos classificaram os testículos em três tipos: Tubular anastomosado, lobular espermatogonial irrestrito e lobular espermatogonial restrito (GRIER, 1993; GRIER; URIBE-ARANZÁBAL, 2009).

#### 3.2 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese inicia no epitélio seminífero a partir das espermatogônias. É um processo altamente complexo de transformação de uma espermatogônia diplóide até a diferenciação das espermátides em gametas masculinos haplóides (HIBIYA, 1982; GRIER, 2002). A duração deste processo pode variar entre as espécies de peixe (BILLARD, 1986). Em geral o processo de duração da espermatogênese em peixes é mais rápido do que em mamíferos (VILELA et al., 2003; NOBREGA et al., 2009; SCHULZ et al., 2010).

Em peixes teleósteos há dois tipos de espermatogênese: cística e semicística. Na espermatogênese cística as células germinativas se desenvolvem completamente no interior dos cistos espermáticos e liberam os espermatozóides maduros no lúmen do túbulo seminífero. Neste tipo as células germinativas apresentam o desenvolvimento sincrônico. Enquanto na espermatogênese semicística espermátide e espermatozoide são liberados no compartimento luminal do túbulo seminífero, apresentando o desenvolvimento assincrônico das células germinativas (MATTEI et al., 1993; SCHULZ et al., 2010).

Estudos revelaram que nos Siluriformes podem ser observados os dois tipos de espermatogênese, sendo o tipo semicística observado em Corydaradinae como exemplo *Corydoras flaveolus*, *Corydoras aeneus*, *Scleromystax lacerdai* e *Aspidoras poecilus* (SPADELLA et al., 2007) e *Anadoras weddellii* (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011). Enquanto o tipo cística é encontrado na maioria dos Siluriformes como *Surubim lima* (QUAGIO-GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999); *Liposarcus anisitsi* (CRUZ et al., 2005); *Rhamdia quelen*, *Pimelodella gracilis* e *Microglanis aff. Parahybae* (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2005); *Diplomystes mesembrinus* (QUAGIO-GRASSIOTTO; OLIVEIRA; GOSZTONYI, 2001); *Callichthys callichthy*, *Megalechis thoracata* e *Hoplosternum littorale* (SPADELLA et al., 2007). Esta característica abrange outros grupos como Cyprinodontiformes a exemplo de *Phalloceros caudimaculatus* (VICENTINI; MUÑOZ; VICENTINI, 2010) e Cypriniformes como *Danio rerio* (RUPIK et al., 2011).

### 3.2.1 Características das células germinativas

Em geral as espermatogônias primárias são as maiores células da linhagem germinativa, apresentam núcleo volumoso, cromatina granular uniformemente distribuída, núcleo esférico e elétron-denso. O citoplasma apresenta ribossomas livres, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e granular e um complexo de golgi bastante desenvolvido. Apresentam também estruturas elétron-densas “nuages” inicialmente próximas ao envelope nuclear e mais tarde se movimentam para o citoplasma associando-se as mitocôndrias (QUAGIO-GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999; BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006; RUPIK et al., 2011).

As espermatogônias primárias se dividem por mitose para dar origem às espermatogônias secundárias. Estas células são visualizadas durante todo o ciclo reprodutivo e podem ser observadas isoladas ou em cistos (ROMAGOSA et al., 1999; VICENTINI; MUÑOZ; VICENTINI, 2010). A espermatogênese sofre várias divisões mitóticas a partir da espermatogônia A indiferenciada. Tais divisões são consideradas uma geração de espermatogônia, como foi observado, em *Danio rerio*, que apresenta nove gerações de espermatogônia e em seguida originam os espermátócitos primários iniciando a fase meiótica (LEAL et al., 2009).

Os espermátócitos primários apresentam estrutura nuclear mais complexa que as espermatogônias, são células visualizadas nas diversas subfases da prófase meiótica que envolve a formação do complexo sinaptonêmico no núcleo. O complexo sinaptonêmico inicia

em zigóteno, seguido pela compactação dos cromossomos homólogos. Estes se completam em paquíteno e desaparecem em diplóteno para facilitar a mudança gênica (BILLARD, 1984; QUAGIO-GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999). Porém o complexo sinaptonêmico ainda aparece em diplóteno nas espécies *Pseudoplatystoma fasciatum* (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006) e *Alcolapia grahami* (PAPAH et al., 2013).

Os espermátócitos secundários apresentam núcleos mais densos com cromossomos em processo de compactação, centríolos nas extremidades da célula e inúmeras vesículas de paredes espessas no citoplasma (QUAGIO-GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999). Porém estas células são difíceis de serem encontradas (ROMAGOSA et al., 1999; CRUZ et al., 2005; VICENTINI; MUNOZ; VICENTINI, 2010; RUPIK et al., 2011).

As células de Sertoli formam barreira hematotesticular para auxiliar no processo de espermatogênese fornecendo fatores necessários para a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células germinativas, além de participarem do processo de fagocitose dessas células (GRIER, 1993; SCHULZ; MIURA, 2002). Segundo Schulz et al. (2010), células de sertoli são mais eficientes em espermatogênese cística observado em peixes por apresentar fatores de crescimento específicos necessários para cada fase de desenvolvimento, resultando em um baixo percentual de apoptose de células germinativas e alto rendimento espermatogênico que em mamíferos com espermatogênese não cística, por ficar em contato com diferentes clones de células germinativas ao mesmo tempo.

As células de Sertoli se caracterizam por apresentar núcleo grande, nucléolo proeminente e citoplasma com retículo endoplasmático não-granuloso, complexo de Golgi bem desenvolvido, além da presença de mitocôndrias, ribossomas livres, polissomas e vesículas. Elas são encontradas no interior dos túbulos seminíferos, sempre associadas às células da linhagem germinativa. No decorrer do ciclo reprodutivo, podem variar em número, forma e tamanho (SCHULZ; MIURA, 2002).

### 3.3 ESPERMIOGÊNESE

Após a meiose I, inicia o processo de espermiogênese que corresponde a diversas modificações morfológicas como: compactação da cromatina, redução do citoplasma e do retículo endoplasmático, quebra das pontes citoplasmática, formação da peça intermediária e do flagelo. Estas modificações auxiliam na diferenciação das espermátides em espermatozóides (CRUZ-LANDIM; CRUZ-HÖFLING, 1986; GUSMÃO; FORESTI; QUAGIO-GRASSIOTTO, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO; OLIVEIRA, 2008; SCHULZ et

al., 2010). Com base nessas modificações, estudos realizados em Perciformes (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006) observaram cinco diferentes estágios de maturação das espermatídes. Na fase I as espermatídes estavam interligadas umas as outras por pontes citoplasmáticas; na fase II ocorreu a redução do núcleo da célula revelando cromatina mais condensada e sinais de formação do flagelo; na fase III as espermatídes permaneceram interligadas, porém o citoplasma se deslocou para uma das extremidades da célula, um ou dois flagelos podem ser observados anexados na peça intermediária; na fase IV as espermatídes apresentaram núcleo com áreas elétricas-lúcidas e canal citoplasmático; na fase V as espermatídes apresentam cromatina fortemente condensada. Nesta fase o citoplasma é reduzido, possui mitocôndrias volumosas que se alojam em torno do flagelo.

Com o intuito de esclarecer o processo de desenvolvimento das espermatídes alguns autores classificaram em várias fases o processo de diferenciação das espermatídes, tornando uma classificação subjetiva, não havendo um padrão clássico. Exemplos: Em *Phalloceros caudimaculatus* classificada em quatro fases (VICENTINI; MUÑOZ; VICENTINI, 2010) e em *Alcolapia graham* em três fases (PAPAH et al., 2013).

O processo final da espermiogênese ocorre com a formação do espermatozoide. Esse processo nos peixes teleósteos pode ser classificado em três tipos. De acordo com Mattei (1970), há dois tipos de espermiogênese, tipo I e tipo II. Enquanto Quagio-Grassiotto e Oliveira (2008) descreveram uma terceira classificação denominada de tipo III. Na espermiogênese do tipo I o flagelo se desenvolve inicialmente em posição lateral, com a rotação nuclear e migração centriolar, o eixo flagelar torna-se perpendicular ao núcleo. Na espermiogênese do tipo II não ocorre rotação nuclear e o núcleo permanece paralelo ao eixo flagelar. Na espermiogênese do tipo III o núcleo não sofre rotação, a fossa nuclear e o canal citoplasmático não se forma. Assim, o eixo flagelar é central e perpendicular ao núcleo.

Na maioria dos Siluriformes os espermatozoides foram encontrados no lúmen do túbulo seminífero contendo cabeça esférica com ausência de acrossoma, fossa nuclear, peça intermediária com poucas mitocôndrias e vesículas, além de um único flagelo com padrão de nove duplas periféricas e uma dupla central como exemplo o observado em *Microglanis aff. Parahybae* (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2005); *Corydoras flaveolus* e *Corydoras aeneus* (SPADELLA et al., 2007), bem como em *Loricaria lata* e *Hypostomus ancistroides* (SPADELLA et al., 2012). Porém, estudos em *Anadoras weddellii*, também do grupo Siluriforme, revelaram espermatozoides com núcleo côncavo, fossa nuclear, peça intermediária e biflagelar (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011). Dentre os Siluriformes as espécies da

família Pimelodidae como *Iheringichthys labrosus* apresentaram uma pequena fossa nuclear, diferente dos *Pimelodus maculatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* onde não foi encontrado fossa nuclear. Contudo nestas espécies o centríolo proximal é perpendicular ao centríolo distal e o desenvolvimento do flagelo é central ao núcleo (SANTOS et al., 2001; QUAGIO-GRASSIOTTO; OLIVEIRA, 2008).

## REFERÊNCIAS

- ALVES, M. C. B.; BARTHEM, R. B. A Pesca Comercial dos “Tucunarés” *Cichla* Spp. (Perciformes, Cichlidae) no Reservatório da UHE-Tucuruí, Rio Tocantins, Pa. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo. v.34, n.4, p.553-561. 2008.
- BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E; BORELLA, M. I. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium an approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**. v.96, p.116-132, 2006.
- BARROS, M. D. M, et al. Reproductive system and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). **Revista Brasileira de Zoologia**. v.24, p.213-221. 2007.
- BILLARD, R. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. **Cell Tissue Research**. v.237, n.2, p.219-226. 1984.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**. v.26, n.4, p.877-920. 1986.
- CARVALHO, J. L; MÉRONA, B. Estudos sobre dois peixes migratórios do baixo Tocantins antes do fechamento da barragem de Tucuruí. **Amazoniana**. v.9, p.595-607. 1986.
- CARVALHO, M. L; GOULDING, M. On the Feeding Ecology of the Catfish *Hypophthalmus fimbriatus* in the Blackwater Rio Negro of the Amazon Basin. **Revista Brasileira de Zoologia**. São Paulo, v.3, n.1, p.33-41. 1985.
- CINTRA, I. H. A, et al. Pescadores artesanais do reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí (Pará, Brasil). **Revista de Ciências Agrárias**. v.54, n.1, p.61-70. 2011.
- COSTA, T.V; OSHIRO, L. M. Y; SILVA, E. C. S. O potencial do mapará *Hypophthalmus* spp. (Osteichthyes, Siluriformes) como uma espécie alternativa para a piscicultura na Amazônia. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo. v.36, n.3, p.165-174. 2010.
- CRUZ, R. J. G; SANTOS, J. E. Testicular structure of three species of neotropical freshwater pimelodids (Pisces, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v.21, n.2, p.267-271. 2004.
- CRUZ-LANDIM, C; CRUZ-HÖFLING, M. A. Aspecto ultraestrutural da espermatogênese de tucunaré, *Cichla ocellaris* (Schneider, 1801) (Teleostei, Cichlidae). **Acta Amazonica**. v.16, n.17, p.65-72.1986.
- CRUZ, C, et al. Structural and ultrastructural characteristics of the spermatogenesis of the grey armored catfish *Liposarcus anisitsi* (Holmberg, 1893) (Teleostei, Siluriformes).

**Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** São Paulo. v.42, n.1, p.37-44. 2005.

FERRARIS, C. J. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types.** Zootaxa 1418. 2007. 628 p.

FISHELSON, L.; DELAREA, Y; GON, O. Testis structure, spermatogenesis, spermatocytogenesis, and sperm structure in cardinal fish (Apogonidae, Perciformes). **Anatomy and Embryology.** v.211, p.31-46. 2006.

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

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

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russel, L.D. e Griswold, M.D. (Eds) **The Sertoli Cell.** Clearwater, FL: Cache River Press. 1993. p.704-730.

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 RL (Ed.). **Proceedings of the Fifty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute,** 2000, Biloxi, Mississippi. Fort Pierce, FL: Gulf and Caribbean Fisheries Institute. 2002. p.537-552.

GRIER, H. J; URIBE-ARANZÁBAL, M. C. The testis and spermatogenesis in teleost. In: Jamieson BGM (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Neotelestomi). Phylogeny-Reproductive System Viviparity - Spermatozoa.** Enfield: Science Publishers. 2009. p.119-142.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology, normal and pathological features.** College of Agriculture. Nihon University. Tokyo, Japan. 1982. 147 p.

LEAL, M. C. et al. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. **Biology Biology of Reproduction.** v.81, p.177-187. 2009.

LOPES, D. C. J. R, et al. Male reproductive system in the South American catfish *Conorhynchus conirostris*. **Journal of Fish Biology.** v.64, p.1419-24, 2004.

MATTEI, X. Spermiogénese comparé des poisson. In: BACCETTI, B. (Ed) **Comparative Spermatology.** Academic Press, New York. 1970. p.57-72.

MATTEI, X. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleosts fish. **Journal of Fish Biology**. v.43, p.931-937. 1993.

MELO, R. M. C, et al. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). **Journal of Morphology**. v.272, p.525-535. 2011.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**. v.35, p.197-206. 2009.

PAPAH. M. B, et al. Morphological evaluation of spermatogenesis in Lake Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*): A fish living on the edge. **Tissue and Cell**. v.45, p.371-382. 2013.

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

QUAGIO-GRASSIOTTO, I; OLIVEIRA, C; GOSZTONYI, A. E. The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. **Journal of Fish Biology**. v.58, p.1623-1632. 2001.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I, et al. Comparative description and discussion of spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in some species of Heptapteridae and Pseudopimelodidae (Teleostei: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**. v.3, n.3, p.401-410. 2005.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I; OLIVEIRA, C. Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). **Zoologischer Anzeiger**. v.247, p.55-66. 2008.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I, et al. Sperm of Doradidae (Teleostei: Siluriformes). **Tissue and Cell**. v.43, p.8-23. 2011.

ROMAGOSA, E, et al. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). **Tissue and Cell**. v.31, n.6, p.540-544. 1999.

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

SANTOS, G. M.; MÉRONA, B.; JURAS, A. A.; JÉGU, M. **Peixes do baixo rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica de Tucuruí**. Brasília: Eletronorte. 2004. 216 p.

SANTOS, J. E, et al. Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lutken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). **Tissue and Cell** v.33, n.5, p.533-540. 2001.

SANTOS, J. E, et al. Morphological characteristics of the testis of the catfish *Pimelodella vittata* (Lutken, 1874). **Journal of Applied Ichthyology**. v.26, p.942-945. 2010.

SANTOS, M. L, et al. Anatomical and Histological Organization of the Testes of the Inseminating Catfish *Trachelyopterus striatulus* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Auchenipteridae). **Journal of Veterinary Medicine**. v.43, p.310-316. 2014.

SCHULZ, R.W, et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**. v.165, p.390-411. 2010.

SCHULZ, R.W; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**. v.26, p.43-56. 2002.

SPADELLA, M. A.; OLIVEIRA, C; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Comparative analysis of spermiogenesis and sperm ultrastructure in Callichthyidae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**. v.5, n.3, p.337-350. 2007.

SPADELLA, M. A.; OLIVEIRA, C; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and sperm ultrastructure in ten species of Loricariidae (Siluriformes, Teleostei). **Zoomorphology**. v.131, p.249-263. 2012

TEUGELS G. G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview In: **The biology and culture of cattishes**. M. Legendre, J.-P. Proteau eds. Aquatic Living Resources. 1996. v.9, p.9-34.

VICENTINI, C. A.; MUÑOZ, M. E; VICENTINI, I. B. F. Ultrastructural aspects of spermatogenesis in *Phalloceros caudimaculatus* (Teleostei, Poeciliidae). **International Journal of Morphology**. v.28, n.3, p.951-956, 2010.

VILELA, D. A. R, et al. Spermatogenesis in teleost insights from the Nile tilapia model. **Fish Physiology and Biochemistry**. v.28, n.1-4, p.187-190. 2003.

#### **4 ARTIGO - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS GERMINATIVAS DE *HYPOPHthalmus marginatus* (VALENCIENNES 1840) DURANTE A ESPERMATOGÊNESE.**

**O Artigo segue as normais da revista *Theriogenology*, a qual foi submetida.**

Resumo: O objetivo do presente estudo foi estudar aspecto estrutural e ultraestrutural das células do epitélio germinativo de *Hypophthalmus marginatus* durante a espermatogênese. Fragmentos da região mediana dos testículos e sêmen foram coletados, processados e analisados por microscopias de luz e eletrônica de transmissão e varredura. Os estudos revelaram que as células espermatogênicas proliferam e se organizam em cistos espermáticos na mesma fase da meiose descrevendo um desenvolvimento sincrônico das células. Durante a espermiogênese as espermátides passam por três fases distintas de diferenciação celular, o núcleo não se move em relação ao eixo flagelar e os centríolos não migram para o núcleo. Os espermatozoides liberados no lúmen do túbulo seminífero apresentaram uma cabeça esférica sem acrossoma, com o núcleo condensado e com depressão caracterizando uma fossa nuclear excêntrica a qual alojava parcialmente o centríolo proximal. A peça intermediária é curta e contém um único flagelo longo com axonema constituído por microtúbulos na organização padrão as demais espécies da mesma família. Isto sugere que espermiogênese de *H. Marginatus* é de tipo III e a presença de fossa nuclear é considerada uma característica distinta para a espécie, quando correlacionada a outros pimelodídeos.

Palavras - chave: Teleósteo; Mapará; Siluriforme; Testículo; Células germinativas.

## 1 Introdução

Pimelodidae é uma família de peixes siluriformes com 53 gêneros amplamente distribuídos na América do sul e central. Na Amazônia o gênero *Hypophthalmus* popularmente conhecido como mapará é constituído por três espécies: *Hypophthalmus edentatus* (Spix, 1929), *H. fimbriatus* (Kner, 1857) e *H. marginatus* (Valenciennes, 1840) [1, 2], estas espécies apresentam ocorrência restrita para algumas regiões da Amazônia. Deste modo na Amazônia oriental ocorre apenas à espécie *H. marginatus* altamente consumida e de grande importância sócio-econômica para a região, sendo um dos recursos pesqueiro mais explorado pela pesca artesanal [3,4].

A espermatogênese é um processo importante que inicia no epitélio seminífero a partir da transformação de uma espermatogônia diplóide, corresponde a diversas modificações que auxilia na diferenciação das espermátides em espermatozóides [5,6,7,8]. Com base nas modificações morfológicas as células germinativas e espermatozóides tem sido alvo de estudos em vários grupos de peixes [9,10,11,12,13]. Bem como a utilização desses dados para identificar relação filogenética entre os Siluriformes Pseudopimelodidae and Heptapteridae [14] e entre indivíduos da mesma família Callichthyidae [15], Pimelodidae [12] e Doradidae [13].

Apesar da importância econômica do *H. marginatus* estudos acerca das características reprodutivas masculinas ainda são desconhecidas. Deste modo, torna-se necessário conhecer os aspectos básicos da espermatogênese desta espécie, que visem colaborar para estudos filogenéticos entre os diferentes grupos de Siluriformes e entre indivíduos de uma mesma família, bem como nas práticas de biotecnologia necessárias para a produção em cativeiro, para o manejo sustentável e a conservação da espécie, visto que esta é um dos recursos pesqueiro mais intensivamente explorado pela pesca artesanal. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar as células germinativas e espermatozóides de *Hypophthalmus marginatus*.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Peixes

Sessenta e nove machos adultos de *H. marginatus* foram capturados no rio Tocantins, a jusante da Usina Hidrelétrica de Tucuruí (03°49'55" S e 49°39'9" W), sudeste do Estado do Pará, Brasil, no período de dezembro de 2011 a dezembro de 2012. A captura foi realizada com auxílio de redes de emalhar de 8 e 9 cm entre nós opostos. Os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1g.L<sup>-1</sup>) e eutanaziados de acordo com as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Em seguida foi realizada uma incisão ventral para a retirada dos testículos, os quais foram fotografados e analisados macroscopicamente quanto a forma, a coloração e a localização na cavidade abdominal. Fragmentos da região mediana dos testículos foram retirados, acondicionados em caixas isotérmicas e submetidos aos procedimentos descritos abaixo:

### 2.2 Microscopia de Luz

Fragmentos da região mediana dos testículos foram fixados em solução de Bouin por 24h, e submetidos ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina (16). Estes foram seccionados a 5µm de espessura em micrótomo Leica (RM 2245), corados em Hematoxilina-Eosina, analisados e fotomicrografados em microscópio óptico (NIKON Eclipse Ci) acoplado a uma câmera digital (NIKON DS-Ri1).

### 2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Fragmentos do testículo foram fixados em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.3) por 24 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.2 por 2 horas. Os tecidos foram desidratados em acetona, infiltrados e incluídos em Epon 812. Secções de semifinos e ultrafinos foram obtidos em um ultramicrótomo Leica (UC6). Os cortes semifinos 0,5 µm foram corados com Azul de Toluidina 1%, analisados e fotomicrografados em microscópio óptico (NIKON Eclipse Ci) acoplado a uma câmera digital (NIKON DS-Ri1) e cortes ultrafinos 70 nm foram contrastados em acetado de uranila 5% e citrato de chumbo 1%, analisados e fotografados em microscópio eletrônico MET LEO 906E (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

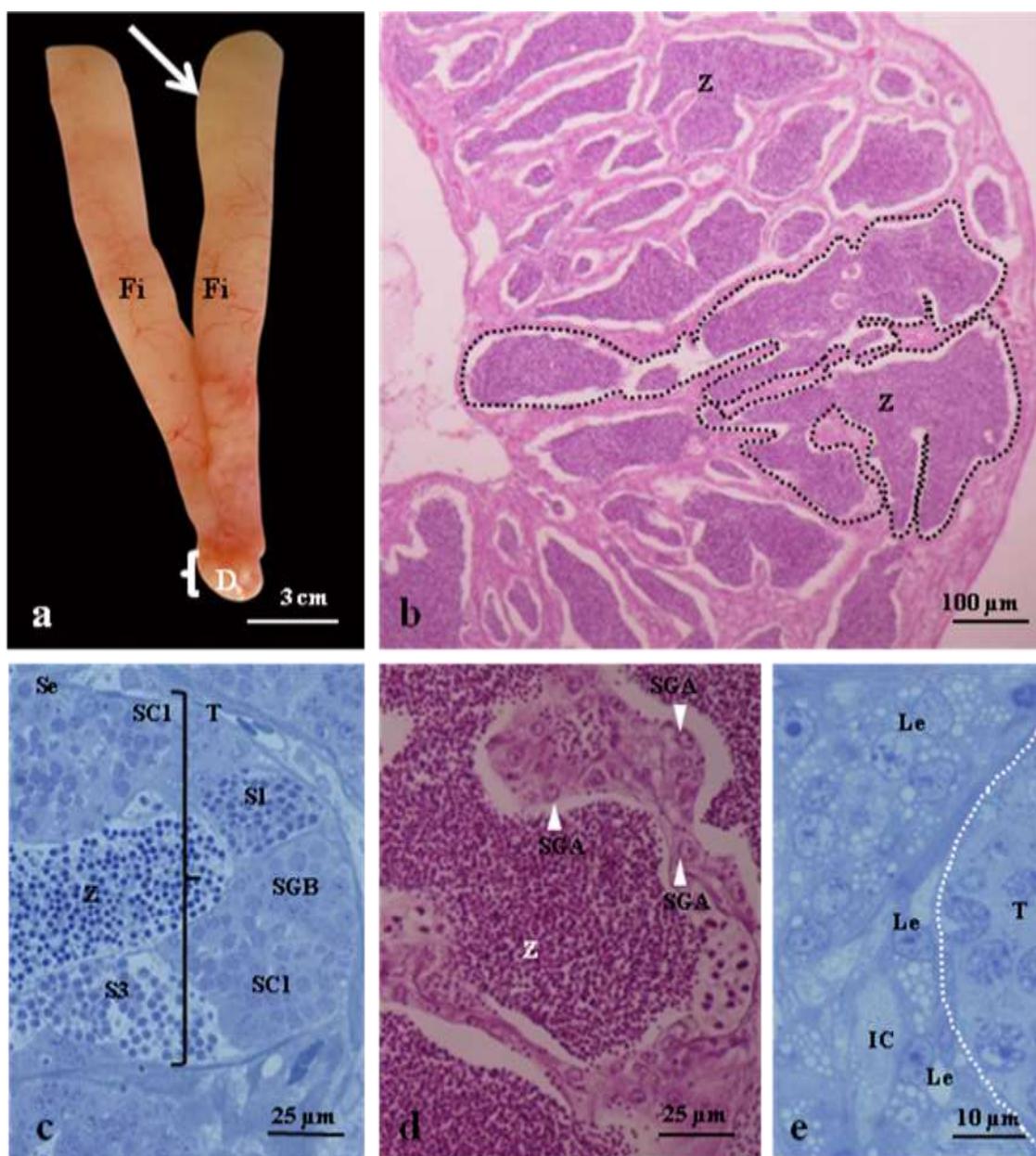
## 2.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Sêmen retirado diretamente da papila urogenital e fragmentos dos testículos foram fixados em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2) por 24 horas. O sêmen foi colocado em lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina. Em seguida, sêmen e fragmentos dos testículos foram pós-fixados em solução de Tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0.1M pH 7.2 por 2 horas, desidratado em série crescente de etanol e secados ao ponto crítico em dióxido de carbono, metalizados com cobertura de ouro e analisados em microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 (LEO-ZEISS, Cambridge, England).

## 3. Resultados

### 3.1 Testículos

Macroscopicamente os testículos de *H. marginatus* são órgãos pares, filiformes, coloração esbranquiçada com irrigações sanguíneas e superfície levemente irregular no período reprodutivo, apresentaram dimensões aproximadamente iguais que se uniram na extremidade caudal até a papila urogenital formando um pequeno ducto espermático (Fig. 2a). Histologicamente os testículos foram revestidos por uma túnica albugínea que emitiu septos para o interior do parênquima testicular, formando túbulo seminífero anastomosado (Fig. 2b e d). Os túbulos seminíferos foram constituídos por um epitélio germinativo contendo duas populações de células distintas: células de Sertoli e células espermatogênicas. As células espermatogênicas apresentaram-se organizadas em cistos em diferentes subfases de desenvolvimento, sendo classificadas de acordo com o aspecto e condensação da cromatina (Figs. 2c e 3a-1). Entre os túbulos foram observados um tecido intersticial constituído por tecido conjuntivo frouxo com presença das células de Leydig e vasos sanguíneos. As células de Leydig apresentaram núcleo esférico com cromatina frouxa e um a dois nucléolos proeminentes. O citoplasma continha inúmeros vacúolos lipídicos (Fig. 2e).



**Fig. 2.** Organização anatômica do testículo de *H. marginatus* e fotomicrografia do túbulo seminífero. **a:** Testículo filiforme (Fi). **b:** Secção transversal do túbulo seminífero ilustrando anastomose tubular (pontilhado preto). **c:** Cistos germinativos em diferentes fases espermatogênicas: espermatogônias secundárias (SGB), espermatócito (SC), espermatídes (S) e espermatozóides (Z) livres no lúmen indicando espermatogênese cística. **d:** Secção transversal do túbulo seminífero ilustrando espermatogônias primárias (SGA) no epitélio germinativo. **e:** Compartimento intersticial (IC) com Células de Leydig (Le) e túbulo seminífero (T) (pontilhado branco). (D) Ducto espermático. (Seta) Sinuosidade. Coloração: **(b,d)** Hematoxilina+Eosina; **(c,e)** Azul de Toluidina.

### 3.2 Histologia das células germinativas

No interior dos túbulos foram identificados seis tipos de células germinativas: espermatogônias primárias, espermatogônias secundárias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermatídes e espermatozóides.

### **3.2.1 Espermatogônias**

As espermatogônias primárias eram as maiores células da linhagem espermatogênica, com citoplasma abundante, núcleo esférico e nucléolo evidente. Essas células foram encontradas ao longo de todo o túbulo seminífero (Figs. 3a-b).

As espermatogônias secundárias eram células menores em relação à primária, núcleo central com dois ou três nucléolos. Essas células foram observadas em grande quantidade dentro dos cistos (Fig. 3c).

### **3.2.2 Espermatócitos**

Os espermatócitos primários foram provenientes das sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias secundárias apresentaram citoplasma escasso, núcleo central e cromatina de aspecto granular caracterizando as diferentes fases da meiose I (Figs. 3d-g).

Os espermatócitos secundários eram menores em relação aos espermatócitos primários apresentaram citoplasma escasso, núcleo central e basófilo com ausência de nucléolo (Fig. 3h).

### **3.2.3 Espermátides**

Nesta fase, as espermátides iniciam o processo de diferenciação, chamado de espermiogênese. Essas células se encontravam em grande quantidade agrupadas em cistos próximas ao lúmen do túbulo com núcleo esférico e basófilo. Foram classificadas de acordo com eliminação do citoplasma em três subtipos: inicial (S1), intermediária (S2) e final (S3).

As S1 apresentaram-se interligadas pelas pontes citoplasmáticas (Fig. 3i). As S2 apresentaram-se parcialmente interligadas (Fig. 3j). As S3 encontraram-se ainda organizadas em cistos germinativos, envolvidas pelos prolongamentos citoplasmáticos da célula de sertoli. Essas células foram observadas livres dentro dos cistos devido ao rompimento total das pontes citoplasmáticas (Fig. 3k).

### **3.2.4 Espermatozóides**

Espermatozoides corresponderam as menores células da linhagem espermatogênica localizados no lúmen do túbulo seminífero. Apresentaram cabeça esférica com núcleo basófilo e sem acrossoma com uma peça intermediária e flagelo (Fig. 3l).

### **3.3 Células de Sertoli**

Células de Sertoli constituíram a parede dos cistos espermáticos. Apresentaram núcleo com formato irregular, podendo ser alongado ou piramidal e citoplasma não evidenciado (Figs.3a,b,f,k).

## **3.4 Ultraestrutura das células germinativas**

### **3.4.1 Espermatogonias**

Espermatogonias primárias (SGA) apresentaram núcleo com eucromatina uniformemente distribuída, nucléolo esférico, eletrondenso e bem definido. O citoplasma continha ribossomos, mitocôndrias de formas variadas associadas às estruturas eletrondensas ou *nuages*, retículo endoplasmático rugoso e pouco retículo endoplasmático liso. Estas células se encontravam circundadas pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (Fig. 4a).

As espermatogonias secundárias (SGB) apresentaram núcleo grande, com predominância de eucromatina e heterocromatina próximo a membrana nuclear. O citoplasma apresentava ribossomos dispersos, mitocôndrias organizadas apenas em um dos pólos da célula, além de retículo endoplasmático rugoso (Fig. 4b).

### **3.4.2 Espermatócitos**

Os espermatócitos primários (SC1) apresentaram-se em diferentes fases da meiose. Na prófase I apresentaram cromatina em processo de condensação com citoplasma reduzido e presença de ribossomos, mitocôndrias nas formas alongadas e arredondadas, retículo endoplasmático rugoso e retículo endoplasmático liso em menor quantidade. Os SC1 em leptóteno apresentaram núcleo com formato variado e nucléolo pouco evidente com cromatina granular fina uniformemente distribuída, iniciando o processo de condensação (Fig. 4c). Os SC1 em zigóteno apresentaram núcleo ovóide, ausência de nucléolo, cromatina granular irregularmente condensada e a formação do complexo sinaptonêmico próximo à membrana

nuclear (Fig. 4d). Os SC1 em paquíteno apresentaram núcleo volumoso e esférico com cromatina filamentososa visíveis e vários complexos sinaptonêmicos (Fig. 4e). Os SC1 em diplóteno revelaram a cromatina condensada próximo à membrana nuclear (Fig. 4f). Os SC1 em diacinese demonstraram pouca visualização da membrana nuclear e cromatina espessa com formato irregular (Fig. 4f). Na fase metáfase apresentaram cromatina condensada na região central da célula e ausência de membrana nuclear (Fig. 4f). Os SC1 em anáfase e telófase não foram visualizados nessa técnica.

Os espermatócitos secundários (SCII) foram observados somente em prófase II e metáfase II. Os SCII em prófase apresentaram cromatina condensada e em metáfase apresentaram cromatina condensada na região central. O citoplasma era escasso com poucas mitocôndrias, algumas vesículas e centríolos (Fig. 4g).

### **3.4.3 Espermatídes**

A técnica de microscopia eletrônica confirmou a presença de três subtipos de espermatídes: (S1), (S2) e (S3). As quais foram classificadas de acordo com a compactação da cromatina e com o aparecimento do flagelo.

As S1 apresentaram-se interligadas dentro dos cistos através de pontes citoplasmáticas, núcleo com cromatina granular uniformemente condensada e citoplasma escasso apresentando mitocôndrias (Fig. 5a).

As S2 apresentaram núcleo com cromatina condensada. Estas células exibiram um citoplasma escasso com algumas vesículas e mitocôndrias. O complexo centriolar não se movimentou em relação ao núcleo apresentando um centríolo proximal perpendicular ao centríolo distal com desenvolvimento de um flagelo em posição medial ao núcleo e presença de fossa nuclear moderada (Figs. 5b-d).

As S3 apresentaram uma fina camada de citoplasma, onde era observado o complexo centriolar rodeado por mitocôndrias e peça principal. O flagelo em desenvolvimento era perpendicular ao núcleo (Fig. 5e). Dentro do cisto germinativo, as S3 se diferenciaram em espermatozóides maduros e os cistos se romperam liberando-os no lúmen do túbulo seminífero (Figs. 6a-d).

### **3.4.4 Espermatozóide**

Os espermatozóides apresentaram cabeça contendo uma membrana de superfície irregular sem acrossoma com núcleo condensado e uma fossa nuclear excêntrica levemente

desenvolvida alojando parcialmente o centríolo proximal. O flagelo era constituído por uma peça intermediária curta contendo mitocôndrias e vesículas de formato variado, uma peça principal longa constituída pelo axonema formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, além de uma peça terminal fina formada somente por microtúbulos periféricos (Figs. 5f-i e 6e-g).

### 3.5 Célula de Sertoli

No interior dos túbulos era visível a presença das células de Sertoli. Estas células apresentaram núcleo com cromatina frouxa e um grande nucléolo esférico e elétron-denso organizado em uma das extremidades do núcleo. O citoplasma apresentou lisossomos, retículo endoplasmático granular desenvolvido, retículo endoplasmático liso e mitocôndrias de formato arredondado. Ainda era possível observar junções celulares tipo zônula de adesão entre as células de sertoli e/ou entre as espermatogônias (Figs. 4a-b,insert).

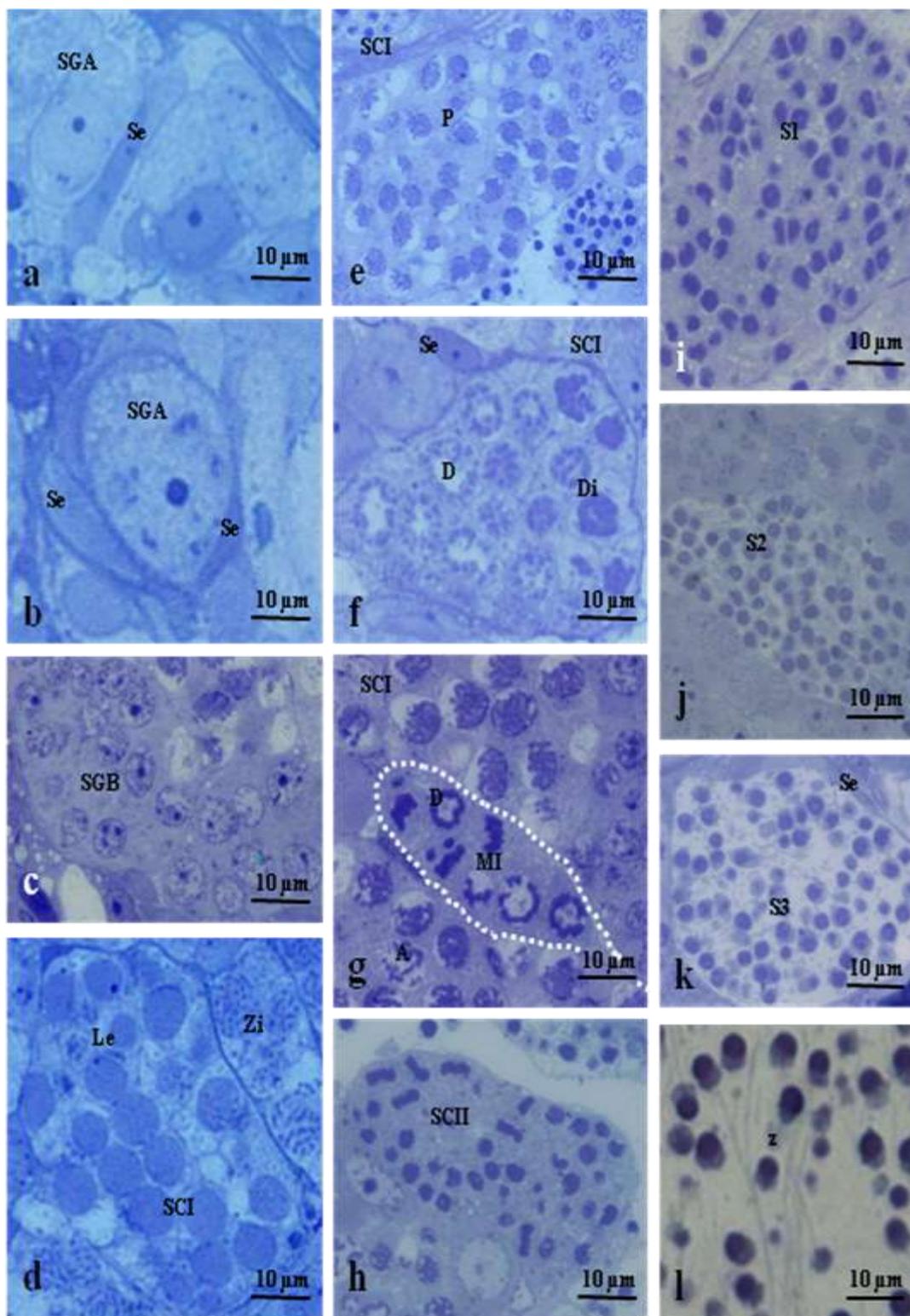
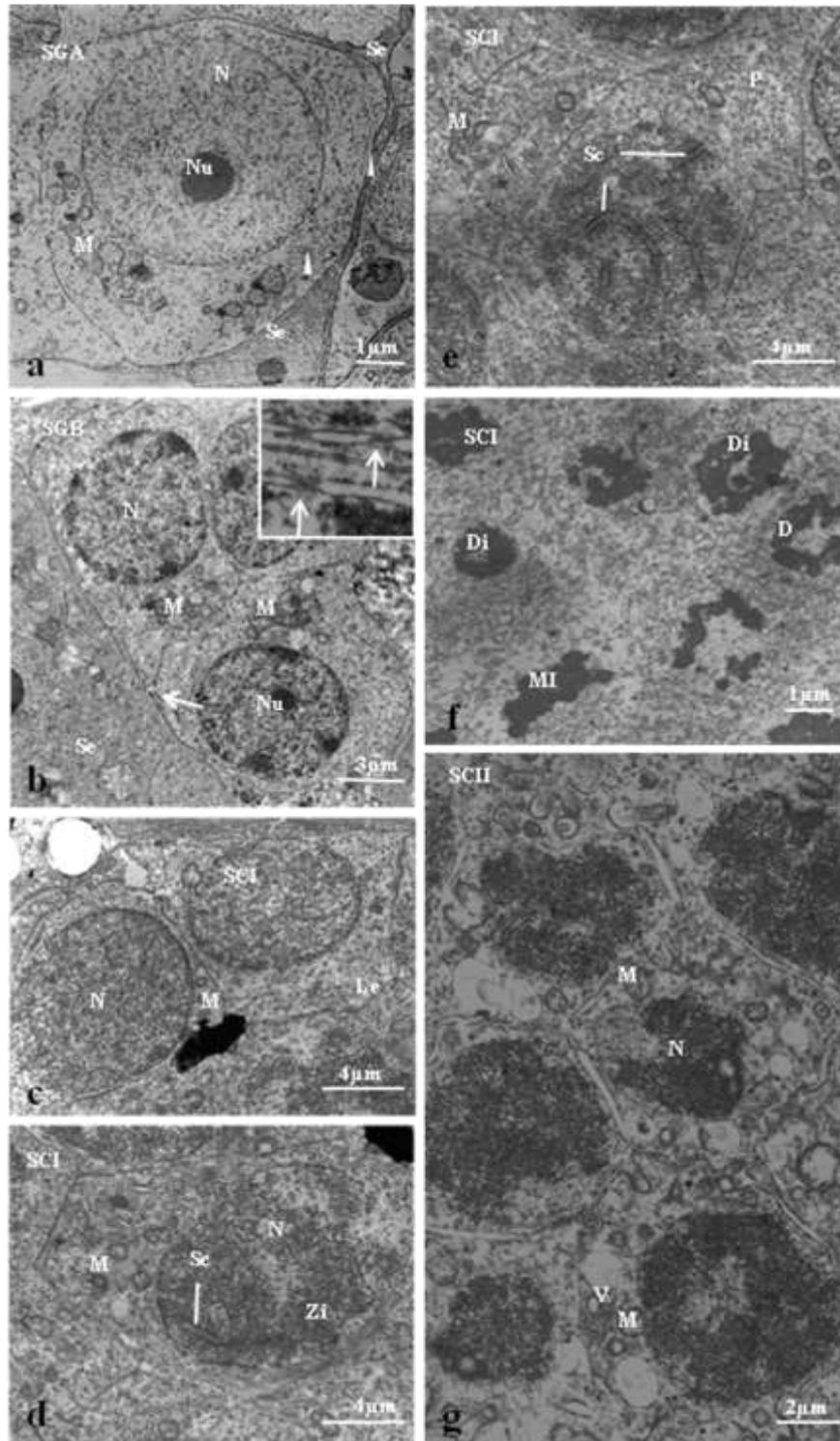
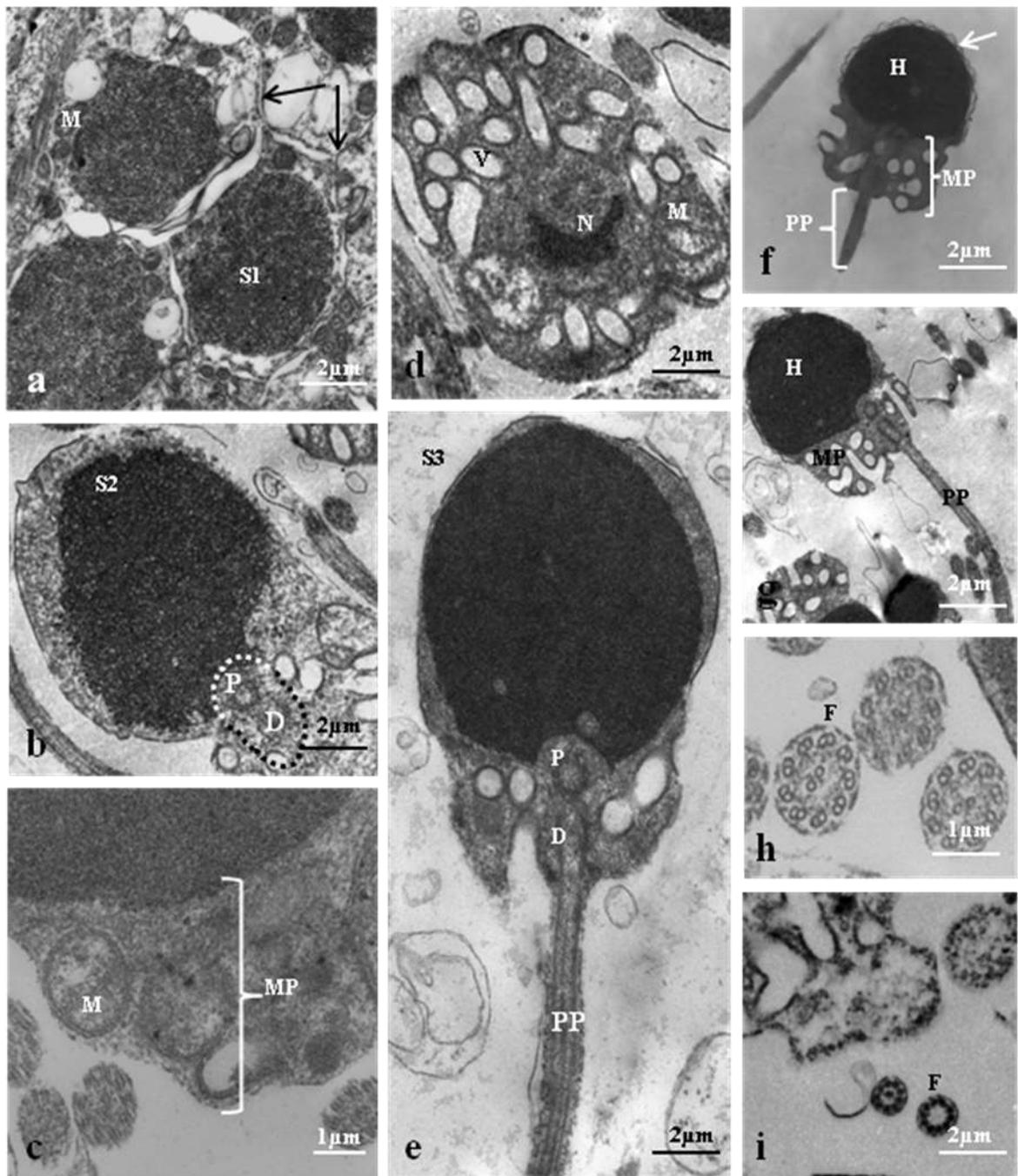


Fig.

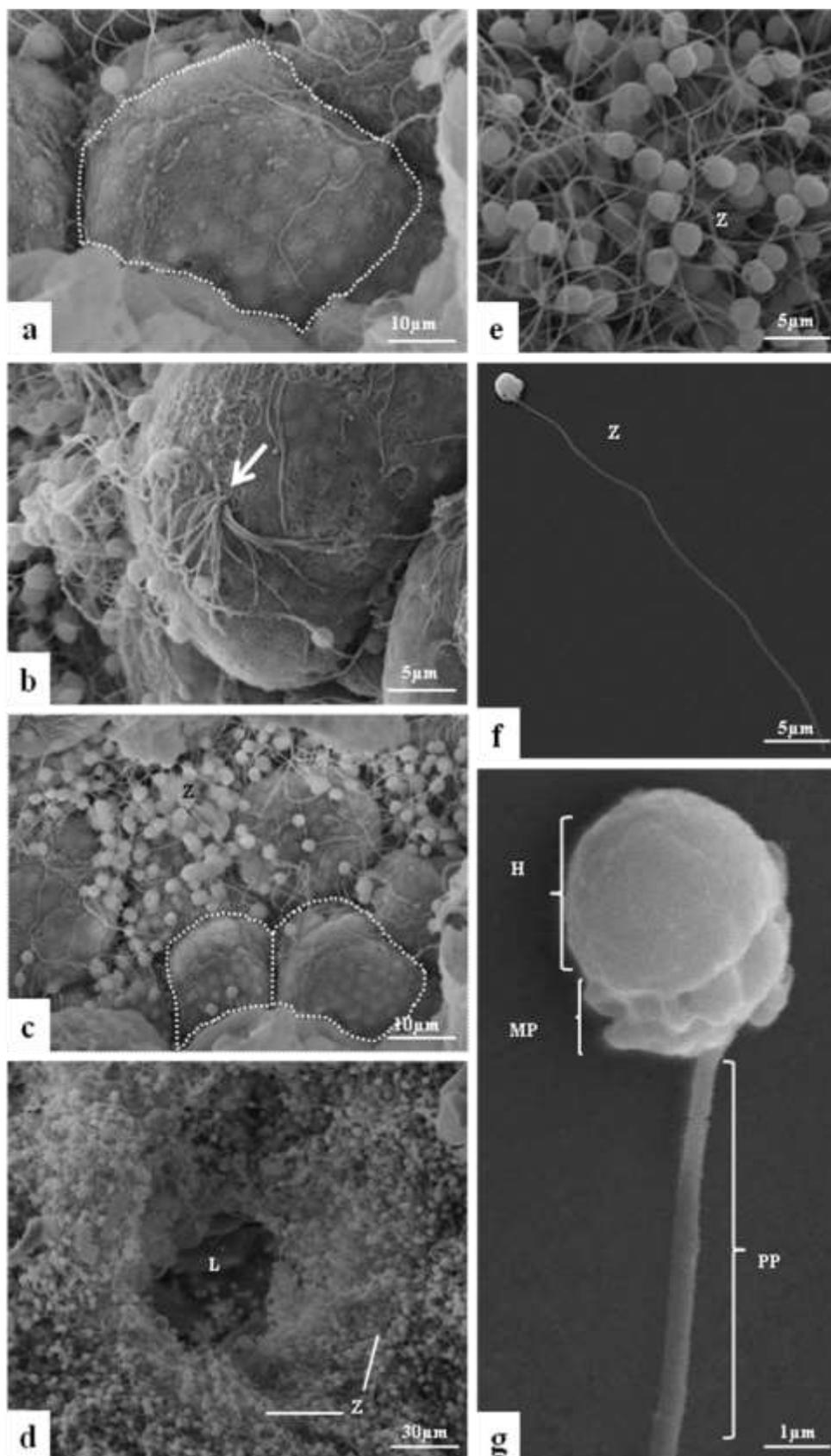
**3.** Fotomicrografia da espermatogênese de *H. marginatus*. Fase mitótica **a-c**: Espermatogônia primária (SGA) com núcleo arredondado. Espermatogônia secundária (SGB) de tamanho menor e núcleo de 2 a 3 nucléolos. Fase meiótica **d-g**: Espermatócito primário (SCI) Leptóteno (Le); Zigóteno (Zi); Paquíteno (P); Diplóteno (D); Diacinese (Di); Metáfase I (MI); Anáfase I (A). **h**: Espermatócito secundário (SCII). Fase espermiogênica. **i-l**: Espermátide inicial (S1); Espermátides intermediária (S2); Espermátide final (S3); Espermatozóides (z) livres no lúmen. Células de Sertoli (Se) envolvendo as células espermatogênicas. Coloração: Azul de Toluidina.



**Fig. 4.** Eletromicrografia das células espermatogênicas de *H. marginatus*. **a:** Espermatogônia primária (SGA) com citoplasma ocupado por mitocôndria (m) associada a nuage; retículo endoplasmático liso (cabeça de seta); núcleo arredondado (N) e um nucléolo visível (Nu). **b:** Espermatogônia secundária (SGB) com núcleo formado por cromatina condensada próxima a membrana nuclear e mitocôndrias organizadas em um pólo da célula. Junção celular (seta branca) entre SGB e célula de Sertoli (Se). Inset: Zônula de adesão entre células. **c-f:** Espermatócito primário (SCI) - Leptóteno (Le) redução de citoplasma e cromatina nuclear condensada; Zigóteno (Zi) - presença do complexo sinaptonêmico próximo a membrana nuclear; Paquíteno (P) - vários complexos sinaptonêmicos bem desenvolvidos. Diplóteno (D) - organização de aglomerado de cromatina próximo à membrana nuclear; Diacinese (Di) - perda da membrana nuclear e cromatina espessa; Metáfase (MI) - cromatina localizada na porção mediana da célula. **g:** Espermatócito secundário (SCII), núcleo volumoso com citoplasma delgado apresentando centríolo (c), vesícula (v) e mitocôndrias (m). Inset (**b**): Barra de escala =2 $\mu$ m



**Fig. 5.** Eletromicrografia da espermiogênese de *H. marginatus*. **a:** Espermátide inicial (S1), interligadas com pontes citoplasmáticas (seta preta). **b:** Espermátides intermediária (S2), presença de uma fossa nuclear (pontilhado) com centríolos proximal (P) e distal (D). **c:** Secção transversal de uma peça intermediária com mitocôndrias (M). **d:** Secção transversal da peça intermediária ilustrando núcleo central (N), mitocôndrias e vesículas (v) ao seu redor. **e:** Espermátide final (S3) secção longitudinal ilustrando núcleo arredondado e volumoso circundado por uma fina camada de citoplasma, peça intermediária com centríolos proximal (P) e distal (D) e peça principal (PP) definida. **f-g:** Espermatozóides com cabeça (H) esférica e membrana de superfície irregular (seta branca), peça intermediária (MP) e peça principal (PP). **h:** Secção transversal da peça principal do flagelo (f). **i:** Secção transversal da peça terminal do flagelo mostrando somente microtúbulos periféricos.



**Fig. 6.** Microscopia eletrônica de varredura do túbulo seminífero de *H. marginatus*. **a:** Cisto germinativo íntegro (pontilhado) com superfície irregular. **b:** Cisto em rompimento liberando espermatozoides. **c:** Cistos germinativos íntegros (pontilhados) e espermatozoides (Z). **d – e:** Lúmen (L) do túbulo seminífero ilustrando grande quantidade de espermatozóide livres. **f-g:** Detalhe do espermatozóide extraído do sêmen ilustrando cabeça arredondada (h), peça intermediária (MP) e Peça principal (PP).

#### 4 Discussão

Os testículos de peixes da ordem Siluriformes apresentam características anatômicas distintas que podem variar tanto entre as famílias como entre as espécies de uma mesma família. Assim, testículos com projeções digitiformes ou franjados foram relatados nas famílias Pseudopimelodidae, em *Lophiosilurus alexandri* (17); Heptapteridae em *Pimelodella vittata* (18) e Pimelodidae em *Iheringichthys labrosus* (19); *Conorhynchus conirostris* (20); *Pseudoplatystoma fasciatum* (21). Entretanto, os testículos do tipo filiforme foram evidenciados em *H. marginatus* apresentando uma leve sinuosidade, provavelmente provocada pelo aumento dos cistos germinativos, característica que o diferencia dos demais Pimelodideos. Entre os Siluriformes da família Auchenipteridae foi evidenciado testículos digitiforme com vesícula seminal evidenciado em *Trachelyopterus galeatus* (22) e *Trachelyopterus striatulus* (23). Além disso, há relatos de testículos com lóbulos dobrados, observado na família Loricariidae em *Rhinelepis áspera* (22).

Histologicamente, os testículos de peixes teleósteos podem ser classificados de três tipos: tubular anastomosado, lobular espermatogonial irrestrito e lobular espermatogonial restrito. No tipo tubular anastomosado os túbulos seminíferos formam uma rede que se interconectam quando o testículo está maturo característica encontrada nos peixes mais basais incluindo os Siluriformes (24). No tipo lobular espermatogonial irrestrito, as espermatogônias se localizam ao longo de todo o túbulo seminífero. Enquanto no tipo lobular espermatogonial restrito as espermatogônias se localizam unicamente na extremidade cega dos túbulos seminíferos, sendo o tipo lobular característica dos peixes neoteleósteos (25). No presente estudo a estrutura testicular caracteriza o tipo tubular anastomosado, espermatogonial irrestrito. Resultados similares foram observados em *Conorhynchus conirostris* (26) e em *Pseudoplatystoma fasciatum* (21), deste modo, sugerimos que essa organização estrutural pode contribuir para uma produção contínua e armazenamento do sêmen o que permite a reprodução periódica da espécie em larga escala na região, por outro lado esse arranjo também pode contribuir para estabelecimento das relações filogenéticas entre espécies da família pimelodideos.

O desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas nos peixes teleósteos podem ser de dois tipos: cística e semicística. No tipo cística a diferenciação do espermatozóide ocorre no interior do cisto, liberando somente os espermatozoides maduros no lúmen do túbulo seminíferos. Enquanto na semicística os cistos se rompem liberando as espermátides e os espermatozoides no lúmen do túbulo [13,27]. No presente estudo a

espermatogênese de *H. marginatus* é do tipo cística, similar ao observado em *Liposarcus anisitsi* [17]; *Callichthys callichthy* [15] e *Hypoptopoma guentheri* [29] porém contrário ao encontrado em *Anadoras weddellii* [13] estabelecida como semicística. Deste modo, sugerimos que a espermatogênese cística contribui para o sucesso reprodutivo da espécie.

As células de Sertoli nos teleósteos desempenham funções de suporte, proteção, nutrição e regulação da maturação das células germinativas [24,30,31]. Em *H. marginatus* as células de Sertoli apresentaram as junções celulares do tipo zônula de adesão entre as próprias células ou com as espermatogônias. Este tipo de especialização de membrana também foi evidenciada em Pimelodidae como *Pseudoplatystoma fasciatum* [32]. Nesse arranjo acreditamos que essa célula mantém o seu papel morfofuncional conforme descrição pelos autores acima, de formar a barreira hematotesticular, e promover um microambiente cístico que favorece o desenvolvimento e a maturação das células germinativas.

As espermatogônias de *H. marginatus* foram as maiores células encontradas nos túbulos seminíferos semelhante aquelas encontradas em outros teleósteos [11,19,28,31]. As espermatogônias primárias foram classificadas em vários tipos, e sua classificação foi baseada no tamanho das células, na morfologia do núcleo, e no aparecimento de nucléolos [26,30]. No entanto, em *H. marginatus* acreditamos ocorrer um tipo de espermatogônia primária com diferentes fases da divisão mitótica, além de espermatogônias secundárias, sugerindo que nesta espécie há apenas duas gerações de espermatogônias. Diferentemente daqueles observados em *Oreochromis niloticus* [33]. Durante a diferenciação de espermatócitos primários para secundários em *H. marginatus* ocorreram mudanças morfológica no núcleo, visualizados pelos complexos sinaptonêmicos que auxiliam na compactação dos cromossomas homólogos e na ausência de nucléolo. Resultados similares foram observados em diferentes grupos de teleósteos [6,30,34,35,36]. Entretanto em *H. marginatus* a compactação surge em zigóteno como elementos laterais e na fase paquíteno como elementos transversais.

Durante a diferenciação das espermátides ocorrem mudanças morfológicas relacionadas com o nível de condensação da cromatina, formação da peça intermediária e do flagelo, bem como a eliminação do citoplasma [6,7,12]. Tais alterações permitiram a classificação das espermátides de *H. marginatus* em três fases de diferenciação celular. Resultados similares foram encontrados em *Alcolapia grahami* e *Danio rerio* [30,37]. No entanto, há relatos de quatro e cinco fases de espermátides como observados em *Phalloceros*

*caudimaculatus* e em cardinal fish [9,10]. Em relação a Pimelodidae ainda não se tem um padrão definitivo.

Há relatos de classificação da espermiogênese de teleósteos em três tipos, baseada na presença ou na ausência da rotação nuclear e na localização do eixo flagelar. Na do tipo I o eixo flagelar é perpendicular ao núcleo e o complexo centriolar penetra na fossa nuclear evidenciado em *Diplomystes mesembrinus*, [38]; em *Microglanis aff. Parahybae* [14] e em *Callichthys callichthy* [15]; na do tipo II não ocorre rotação nuclear, o complexo centriolar permanece paralelo ao núcleo com uma ligeira fossa nuclear; e na do tipo III não ocorre rotação nuclear, o flagelo desenvolve-se em uma posição central e perpendicular ao núcleo como ocorre em *Pimelodus maculatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* [12] e em *Hypostomus ancistroides* [29]. No presente estudo determinamos a espermiogênese do tipo III, em que acreditamos que a organização nuclear nos espermatozoides favoreça a mobilidade celular mais ativa no ambiente aquático e a fecundação.

O espermatozóide de *H. marginatus* consiste em cabeça, peça intermediária curta e peça principal no padrão clássico de 9+2 microtúbulos e peça terminal fina constituída por 9+0 pares de microtúbulos. Na peça intermediária apresentaram as vesículas, estruturas semelhante aqueles observados em Pimelodidae, *Iheringichthys labrosus*; *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pimelodus maculatus* [12,19,36]. No presente trabalho os espermatozoides *H. marginatus* apresentam uma fossa nuclear moderada, contrapondo aos observados em outros pimelodídeos como em *Pseudoplatystoma fasciatum* e em *Pimelodus maculatus* por [12]. Sugerindo que a presença da fossa nuclear seja uma característica peculiar da espécie *H. marginatus*.

## 5 Conclusão

No presente trabalho algumas características permanecem conservadas na família Pimelodidae como a espermatogênese do tipo cística, a espermiogênese do tipo III embora tenham apresentado fossa nuclear, o espermatozóide uniflagelar e ausência de canal citoplasmático bem como a estrutura testicular do tipo tubular anastomosado com desenvolvimento espermatogonial irrestrito considerando a distribuição das espermatogônias primárias ao longo da extensão do túbulo seminífero. As células de sertoli formaram os cistos germinativos considerando a localização destas dentro do túbulo seminífero. Contudo, ainda faltam dados para completar a espermatogênese e espermiogênese da família, e especificamente em outras espécies do gênero *Hypophthalmus*.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Vale do Rio Doce pelo financiamento do projeto Protocolo: 2010/51271-6 e a Fundação Amazônia de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pela concessão de bolsa.

## REFERÊNCIAS

- [1] TEUGELS G. G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview In: The biology and culture of catfishes. M. Legendre, J.-P. Proteau eds. Aquat. Living Resour 1996; v. 9, Hors série, 9-34.
- [2] FERRARIS, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa 2007; 1418: p.1-628.
- [3] CARVALHO, J. L.; MÉRONA, B. Estudos sobre dois peixes migratórios do baixo Tocantins antes do fechamento da barragem de Tucuruí. Amazoniana 1986; v. 9, p. 595-607. 1986.
- [4] ALVES, M. C. B.; BARTHEM, R. B. A Pesca Comercial dos “Tucunarés” *Cichla* Spp. (Perciformes, Cichlidae) no Reservatório da UHE-Tucuruí, Rio Tocantins, Pa. B. Inst. Pesca, São Paulo 2008; 34(4): p. 553 – 561.
- [5] HIBIYA, T. An atlas of fish histology, normal and pathological features. Coll. Agric., Nihon Univ. Tokyo, Japan 1982, 147 p. ISBN 3-437-30388-0.
- [6] GRIER HJ. 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 (Ed.). Proceedings of the Fifty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 2000, Biloxi, Mississippi. Fort Pierce, FL: Gulf and Caribbean Fisheries Institute 2002. p.537-552.
- [7] CRUZ-LANDIM, C.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Aspecto ultraestrutural da espermatogênese de tucunaré, *Cichla ocellaris* (Schneider, 1801) (Teleostei, Cichlidae) Acta Amazonica 1986; 16/17:65-72.
- [8] GUSMÃO, P., FORESTI, F., QUAGGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructure of spermiogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). Tissue Cell 1999. v. 31, n. 6, p. 627–633.
- [9] FISHELSON, L.; DELAREA, Y.; GON, O. Testis structure, spermatogenesis, spermatocytogenesis, and sperm structure in cardinal fish (Apogonidae, Perciformes). Anat Embryol 2006; 211:31–46.
- [10] VICENTINI, C. A.; MUÑOZ, M. E.; VICENTINI, I. B. F. Ultrastructural aspects of spermatogenesis in *Phalloceros caudimaculatus* (Teleostei, Poeciliidae). Int. J. Morphol 2010; 28(3): 951-956.
- [11] RUPIK, W.; HUSZNO, J.; KLAG, J. Cellular organisation of the mature testes and stages of spermiogenesis in *Danio rerio* (Cyprinidae; Teleostei) Structural and ultrastructural studies. Micron 2011; 42,833–839.
- [12] QUAGGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm

- ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoologischer Anzeiger* 2008; 247:55–66.
- [13] QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; R. J. ORTIZ.; M. H. SABAJ PÉREZ.; C. OLIVEIRA. Sperm of Doradidae (Teleostei: Siluriformes). *Tissue and Cell* 2011; 43: 8-23.
- [14] QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; SPADELLA, M. A.; CARVALHO, M.; OLIVEIRA, C. Comparative description and discussion of spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in some species of Heptapteridae and Pseudopimelodidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology* 2005; 3(3): 401-410.
- [15] SPADELLA, M. A.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Comparative analysis of spermiogenesis and sperm ultrastructure in Callichthyidae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology* 2007; 5(3):337-350.
- [16] PROPHET, E. B.; MILIS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP), Washington (DC). 1995.
- [17] BARROS, M.D.M.; GUIMARAES-CRUZ, R.J.; VELOSO-JUNIOR, V.C.; SANTOS, J.E. Reproductive system and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). *Revista Brasileira de Zoologia*. 24:213–221. 2007.
- [18] SANTOS, J. E.; VELOSO–JUNIOR, V. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; HOJO, R. E. S. Morphological characteristics of the testis of the catfish *Pimelodella vittata* (Lütken, 1874). *J. Appl. Ichthyol.* 26, 942–945. 2010
- [19] SANTOS, J. E; BAZZOLI, N; RIZZO, E; SANTOS, G. B. Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lutken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae) *Tissue & Cell* 2001; 33(5)533-540.
- [20] LOPES, D. C .J. R.; BAZZOLI, N.; BRITO, M. F. G.; MARIA, T. A. Male reproductive system in the South American catfish *Conorhynchus conirostris*. *Journal of. Fish Biology* 64: 1419-1424. 2004.
- [21] BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium an approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science* 96:116–132. 2006
- [22] MELO, R. M. C.; ARANTES. F. P.; SATO, Y.; SANTOS, J. E.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). *J. Morphol.* 272, 525–535. 2011
- [23] SANTOS, M. L.; SALES, N. G.; ARANTES, F. P.; PESSALI, T. C.; BAZZOLI, N.; SANTOS, J. E. Anatomical and Histological Organization of the Testes of the Inseminating Catfish *Trachelyopterus striatulus* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Auchenipteridae). *Journal of Veterinary Medicine*. 43, 310–316. 2014.

- [24] GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russel, L.D. e Griswold, M.D. (Eds) The Sertoli Cell. Clearwater, FL: Cache River Press 704-730. 1993
- [25] GRIER, H. J.; URIBE-ARANZÁBAL, M. C. The testis and spermatogenesis in teleost. In: Jamieson BGM (Ed.). Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Neoteleostomi). Phylogeny-Reproductive System Viviparity-Spermatozoa. Enfield: Science Publishers, p.119-142. 2009.
- [26] LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S.R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. *Biology of Reproduction* 2009; 81:177–187.
- [27] MATTEI, X. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleosts fish. *Journal of Fish Biology* 1993; 43:931-937.
- [28] CRUZ, C.; ORSI, A. M.; SIMÕES, K.; VICENTINI, C. A. Structural and ultrastructural characteristics of the spermatogenesis of the grey armored catfish *Liposarcus anisitsi* (Holmberg, 1893) (Teleostei, Siluriformes). *Braz. J vet Res anim Sci, São Paulo* 2005; 42(1):37-44.
- [29] SPADELLA, M. A.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and sperm ultrastructure in ten species of Loricariidae (Siluriformes, Teleostei). *Zoomorphology* 2012; 131:249–263.
- [30] SCHULZ, R.W.; FRANÇA, L. R.; JEAN-JACQUES, L.; LEGAC, F.; CHIARINI-HELIO, G.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 2010;165:390–411.
- [31] SCHULZ, R.W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 2002; 26:43–56.
- [32] BATLOUNI, S. R.; CARRENO, F.; R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatus* (Pisces, Siluriformes). *J Mol Hist* 2005; 36:97–110.
- [33] NÓBREGA, R.H., BATLOUNI, S.R., FRANÇA, L.R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 2009; 35, 197–206.
- [34] BILLARD, R. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 1984; 237:219-226.
- [35] QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; CARVALHO, E. D. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. *Tissue & Cell* 1999;31(6):561–567.

- [36] ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; BORELLA, M. I.; PARREIRA, S. F.; FENERICH-VERANI, N. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). *Tissue & Cell* 1999;31(6):540–544.
- [37] PAPA, M. B.; KISIA, S. M.; OJOO, R. O.; MAKANYA, A. N.; WOOD, C. M.; KAVEMBE, G. D.; MAINA, J. N.; JOHANNSSON, O. E.; BERGMANG, H. L.; LAURENT, P.; CHEVALIER, C.; BIANCHINI, A.; BIANCHINI, L. F.; ONYANGO, D. W. Morphological evaluation of spermatogenesis in Lake Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*): A fish living on the edge. *Tissue and Cell* 2013;45:371–382.
- [38] QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI, A. E. The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. *Journal of Fish Biology* 2001; 58:1623–1632.