GISELE CRISTIANE DE MELO DIAS

**CARACTERIZAÇÃO, ISOLAMENTO E CULTURA DE
ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE CURIMBATÁ,**

Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1847).

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2015

GISELE CRISTIANE DE MELO DIAS

**CARACTERIZAÇÃO, ISOLAMENTO E CULTURA DE
ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE CURIMBATÁ,
Prochilodus lineatus (Valencienes, 1847).**

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

**Versão corrigida. A versão original
eletrônica encontra-se disponível tanto
na Biblioteca do ICB quanto na
Biblioteca Digital de Teses e Dissertações
da USP (BDTD).**

São Paulo

2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Dias, Gisele Cristiane de Melo.

Caracterização, isolamento e cultura de espermatogônias primárias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) / Gisele Cristiane de Melo Dias. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Borella.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Endocrinologia de peixes.

Versão do título para o inglês: Characterization, isolation and culture of primary spermatogonia of curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847).

1. Espermatogônias primárias 2. Morfometria 3. Estereologia 4. Cultura de células 5. Testículos 6. Peixes teleósteos I. Borella, Profa. Dra. Maria Inês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB02/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gisele Cristiane de Melo Dias.

Título da Tese: Caracterização, isolamento e cultura de espermatogônias primárias de curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Valencienes, 1847).

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Inês Borella.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Linen Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **129** nas fls. **76** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Inês Borella, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Caracterização, isolamento e diferenciação de espermatozônias tronco de curimatá: padronização de métodos** do qual participou(arão) o(s) alunos **Gisele Cristiane de Melo Dias, Sara Maria Zago Gomes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **22.09.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 23 de setembro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.108.12
WTL/mcgn

São Paulo, 30 novembro de 2012.

REF.: Protocolo nº 129/09.

"Caracterização, isolamento e diferenciação de espermatogônias tronco de curimatá: padronização de métodos"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 22.09.2015.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.

Prof^a Dra. Maria Inês Borella

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*"Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem
perder o que, com frequência, poderíamos
ganhar, por simples medo de arriscar."*

William Shakespeare

*Dedico esta tese ao amor da minha vida,
Israel, pelo apoio incondicional em todos os
momentos, principalmente nos de incerteza,
muito comuns para quem tenta trilhar
novos caminhos!*

*Sem você nenhuma conquista valeria a
pena!*

*Aos meus pais Vanadir e Suely, que
dignamente me apresentaram a importância
da família e ao caminho da honestidade e
persistência!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de prestar meu agradecimento ao nosso querido Deus, que abriu este caminho na minha vida e concedeu o que o meu coração tanto almejava: o doutorado! A Ele eu agradeço por me dar esta tão grande oportunidade de estudar, e o mais importante: por me dar condições de cumprir com o meu compromisso numa etapa tão difícil e ao mesmo tempo tão importante da minha vida! A Ele eu devo toda a minha gratidão, pois sempre esteve acima de tudo na minha vida! Além do mais, me deu força, coragem, e me atendeu em todos os momentos!

Ao meu queridíssimo esposo, Israel, faltam palavras de gratidão! Esteve ao meu lado em todos os momentos: difíceis, de alegria, de vitória, e outros! Esta pessoa me deu todo o apoio, e foi mais que o suficiente para me incentivar e me levar adiante. Encheu-me de amor, dedicação e, acima de tudo, teve muita paciência!!!

Aos meus queridos pais, Vanadir e Suely, sou eternamente grata! Foram maravilhosos, pois sempre me ensinaram a nunca desistir. Deram-me amor, carinho e, desde cedo, ensinaram-me boas condutas, e sempre a respeitar e amar o próximo!

À minha querida família que amo muito! Irmãs, cunhados e cunhadas, sogro (*in memoriam*) e sogra, apesar de conviver longe de todos, os momentos que vivenciamos juntos foram maravilhosos e inesquecíveis, o suficiente para me encher de força e alegria, para eu poder continuar com o meu trabalho. Vocês foram mais que maravilhosos!

A uma pessoa muito especial: minha queridíssima orientadora Profa. Maria Inês Borella! Eu expresso minha imensa gratidão pela confiança depositada em mim e por permitir que eu fizesse parte do seu "cardume"! Agradeço pela sincera amizade e ajuda nos momentos difíceis. Sempre com palavras de apoio, me enchia de vigor e esperança para continuar lutando. Considero-me uma pessoa privilegiada por ter tido uma pessoa tão especial ao meu lado durante este período! Conviver no teu laboratório significou ter a oportunidade de crescer, científica e intelectualmente!

Agradeço à profissional e amiga Amazonita! Agradeço pela amizade, conselhos e incentivo que me concedeu desde o ingresso ao doutorado. Foi importante também na minha vida pessoal, orientando-me da melhor forma a seguir o meu coração!

Ao Prof. Sérgio Ricardo Batlouni por depositar a sua confiança em mim, convidando-me a trabalhar neste projeto, pela valiosa orientação durante o trabalho, e pela doação dos exemplares de *Prochilodus lineatus* (larvas e adultos) utilizados durante o trabalho.

Agradeço ao técnico e amigo Cruz Alberto Mendonza Rigonati pela amizade e ajuda nos procedimentos de laboratório, e por me ajudar a cuidar dos meus "peixinhos"!

Sou imensamente grata à Profa. Dra. Estela Bevilacqua por me ceder o seu laboratório e o que fosse necessário, em especial, para que eu pudesse realizar os experimentos de cultura!

Sou imensamente grata à técnica Rose! Esta foi amiga nos momentos difíceis, defensora, e professora, pois me ensinou com muita dedicação, carinho e paciência a trabalhar com a cultura celular. Este conhecimento eu devo a ela!

Agradeço ao Prof. Sérgio Ferreira de Oliveira por ceder o seu laboratório para a captura das imagens de microscopia de luz, e pelas orientações valiosas dadas no meu trabalho.

Sou muito grata à Professora Telma Maria Tenório Zorn por ceder o seu laboratório para o uso do microscópio fluorescência, sua técnica Fernanda Angela Correia Barrence e seu aluno de pós-graduação, Rafael, pela ajuda durante a captura da imagens.

Agradeço ao técnico Sr. Valdecir Fernandes de Lima e toda à sua equipe, do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), pelo empenho dedicado ao meu trabalho quando realizado durante as doações e coletas de curimatá.

Agradeço à CESP, Companhia Energética do Estado de São Paulo, especialmente ao Dr. Danilo Caneppele, que permitiu, com muito carinho, a doação dos exemplares de *Prochilodus lineatus* (larvas e adultos). O Dr. Danilo se mostrou sempre muito atencioso, atendendo-me em todos os momentos que precisei.

Aos colegas do laboratório de Endocrinologia de Peixes, Lázaro, Mateus, Chayrra, Mônica, Giovana e Marília, pela grande amizade e ajuda durante o trabalho.

Sou grata a Dra. Sara Maria Zago Gomes pela amizade e por me orientar no início do trabalho com a cultura celular.

Ao técnico Sr. Gaspar Ferreira de Lima, por me atender com carinho e dedicação e me orientar no processamento das amostras de microscopia eletrônica.

Ao Prof. Dr. Victor Arana, e ao técnico do Setor de Microscopia Eletrônica, Sr. Edson Rocha de Oliveira do Departamento de Biologia Celular e Tecidual, pela aquisição das imagens.

À técnica Sra. Emília Ribeiro, pelo amizade conquistada e ajuda no decorrer do doutorado.

Ao técnico Fernando Delgado Pretel, especialista em Citometria de Fluxo, do Centro de Facilidades de apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP-USP), por me auxiliar com muita dedicação e adquirir as células no *Cell Sorting*.

Ao Departamento de Biologia Celular e Tecidual, pelas facilidades e apoio financeiro dado em alguns momentos no decorrer do trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido ao Laboratório como taxa de bancada de bolsa PNPd, que foi importante para que eu iniciasse os trabalhos de cultura de células.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de Doutorado, e importantíssimo apoio financeiro proveniente da Reserva Técnica, permitindo não só a realização do meu projeto, como o patrocínio a viagens a curso e congressos no exterior.

As pessoas mencionadas aqui ainda não fecham o círculo de pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Muitas outras pessoas também serão lembradas na minha memória, pois favoreceram, de alguma forma, a realização deste grande sonho!

A todos, eu deixo o meu MUITO OBRIGADO! Do fundo do meu coração!

RESUMO

DIAS, G. C. M. **Caracterização, isolamento e cultura de espermatogônias primárias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847).** 2015. 144 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Prochilodus lineatus (curimatá) é uma espécie sulamericana de teleósteo que oferece grandes vantagens à piscicultura, pela sua prolificidade e pela facilidade com que se podem fecundar artificialmente os seus ovócitos. O objetivo principal do presente trabalho foi obter informações básicas sobre os testículos e suas células na evolução da espermatogênese, especialmente as espermatogônias primárias; avaliar a proporção volumétrica dos testículos ocupada por estruturas do compartimento tubular e intertubular, das regiões anterior-A, média-M e posterior-P dos testículos; e determinar o número médio das espermatogônias primárias por testículos, além de determinar a fase e a subfase reprodutiva dos animais utilizados nas análises estereológica e morfométrica, para obter informações para isolar e cultivar as espermatogônias primárias *in vitro*. Machos adultos de *P. lineatus* tiveram suas gônadas coletadas e fixadas. Em seguida, os fragmentos das regiões A, M e P foram processados de acordo com as rotinas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Análises histológicas, estereológicas e morfométricas foram feitas. Para a cultura de células, os testículos foram digeridos enzimaticamente, a suspensão testicular foi separada por gradiente descontínuo com Percoll seguido pelo plaqueamento diferencial por adesão. As células foram cultivadas em meio de cultura propício para proliferação celular e para diferenciação com a adição de BrdU. As células cultivadas foram analisadas pelo método de imunofluorescência com anticorpos anti-Vasa, anti-GFR α 1, anti-OCT4 e anti-BrdU. Foi realizado o método de enriquecimento das espermatogônias por citometria de fluxo. Os dados estereológicos sugerem que os componentes dos compartimentos tubular e intertubular dos testículos de *P. lineatus* apresentam distribuição uniforme nas regiões A, M e P. Os resultados deste estudo contribuem para melhor compreensão da estrutura e morfologia dos testículos e, principalmente, a caracterização das espermatogônias primárias em *P. lineatus*. Ao que se saiba, não há relato na literatura sobre a investigação estereológica da proporção volumétrica dos componentes testiculares (tubular e intertubular) em diferentes regiões dos testículos, e avaliação estereológica e morfométrica do número de espermatogônias primárias por testículos em teleósteos. Os testículos coletados em maio apresentam as três regiões com distribuição semelhante dos tipos de células, e o diâmetro nuclear das células germinativas diminui significativamente durante a espermatogênese. As espermatogônias cultivadas por 15 dias com meio de cultura propício para proliferação celular resultaram em grandes aglomerados celulares que foram caracterizados com o anti-Vasa, anti-GFR α 1 e anti-OCT4. Não houve diferença aparente entre as amostras que receberam o extrato embrionário de *P. lineatus* (EEPI) e as amostras que não receberam o EEPI quando se adicionou o meio de cultura indicado para diferenciação celular. Foi observado nas culturas processo de proliferação lento das espermatogônias primárias comparado com a cultura que teve o meio indicado para proliferação celular. Os estudos morfológicos por meio de análises morfométricas, histoquímicas e imuno-histoquímicas, aliados a condições específicas de cultura celular, poderão esclarecer alguns aspectos da regulação espermatogonial e aprimorar o entendimento da regulação do processo de manutenção *in vitro* das células germinativas, o que contribuirá para o aprimoramento de técnicas de reprodução *in vivo* e *in vitro*.

Palavras-chave: Espermatogônias primárias. Morfometria. Estereologia. Cultura de células. Testículos. Peixes teleósteos.

ABSTRACT

DIAS, G. C. M. **Characterization, isolation and culture of primary spermatogonias of curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847).** 2015. 144 p. Ph. D. Thesis (Cell Biology and Tissue) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Prochilodus lineatus (curimatá) is a South American species of teleost that offers great advantages to fish farming, for its fantastic prolificacy and the ease with which one can artificially fertilize their oocytes. The main objective of this study was to obtain basic information about the testes and its cells in the evolution of spermatogenesis, especially primary spermatogonia; to evaluate the volume proportion of the testes occupied by the tubular and intertubular compartment structures of the anterior-A, middle-M, and posterior-P regions of the testes; to determine the mean number of primary spermatogonia per testes; and to determine the reproductive subphase and phase of the animals used for stereological and morphometric analyzes to have information to isolate and culture *in vitro* primary spermatogonia. Adult males of *P. lineatus* had their gonads extracted and fixed. Then, fragments of the A, M, and P regions were used according routines of light microscopy and transmission electron microscopy. Histological, stereological, and morphometric analyses were made. The testes were enzymatically digested; testicular suspension was separated by discontinuous gradient with Percoll followed by adhesion differential plating. The cells were cultured in culture medium conducive to cell proliferation and differentiation with addition of BrdU. The cultured cells were analyzed by immunofluorescence with anti-Vasa, anti-GFR α 1, anti-OCT4 and anti-BrdU. The enrichment of the spermatogonia was carried by flow cytometry. The stereological data suggest that components of the tubular and intertubular compartments of the *P. lineatus* testes present uniform distribution in the A, M, and P regions. The results from this study contribute to a better understanding of the morphology and structure of the testes and, mainly, the characterization of the type A spermatogonia in *P. lineatus*. To our knowledge, there is no report in the literature dealing specifically the stereological investigation of the volumetric proportion of the testicular components (tubular and intertubular) in different regions of the testes, and stereological and morphometric evaluation of the number of type A spermatogonia per testes in teleosts. In addition, that testes collected in May present three regions with similar distribution of cell types, and nuclear diameter of germ cells decreases significantly during spermatogenesis. The spermatogonia cultured for 15 days with culture medium conducive to cell proliferation resulted in large cell agglomerates which were characterized with the antibodies anti-Vasa, anti-GFR α 1 and anti-OCT4. There was no apparent difference in the samples that received *P. lineatus* embryo extract (EEPI), and the samples that did not receive the EEPI, when culture medium conducive to cell differentiation was added. Slow proliferation process of primary spermatogonia was observed in cultures compared to cell culture medium conducive to cell proliferation. The morphological studies by morphometric, histochemical and immunohistochemical analysis, combined with specific conditions of cell culture, may explain some aspects of spermatogonial regulation, and may enhance the understanding of the regulation of the *in vitro* maintenance of germ cells, which will contribute to the improvement of reproductive *in vivo* and *in vitro* techniques.

Keywords: Primary spermatogonia. Morphometry. Stereology. Cell culture. Testes. Teleost fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – TESTÍCULO DE MAMÍFEROS.	25
FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DO ARRANJO CÍSTICO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DOS TELEÓSTEOS.	26
FIGURA 3 – ETAPAS DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO EM TELEÓSTEOS.	28
FIGURA 4 – EXEMPLARES DE <i>Prochilodus lineatus</i>	35
FIGURA 5 – EXEMPLO DO RETÍCULO UTILIZADO SOBRE AS IMAGENS NA ESTEREOLOGIA DOS COMPONENTES TESTICULARES DE <i>Prochilodus lineatus</i>	41
FIGURA 6 – EXEMPLO DO RETÍCULO UTILIZADO SOBRE AS IMAGENS NA ESTEREOLOGIA E MORFOMETRIA DA ESPERMATOGÔNIA PRIMÁRIA DE <i>Prochilodus lineatus</i>	43
FIGURA 7 – Aclimação dos exemplares de <i>Prochilodus lineatus</i> antes de serem utilizados nos procedimentos para obtenção das espermatogônias primárias.....	46
FIGURA 8 – COLETA DOS TESTÍCULOS DE <i>Prochilodus lineatus</i> PARA OBTENÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS.	48
FIGURA 9 – PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO PARA OBTENÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE <i>Prochilodus lineatus</i>	49
FIGURA 10 – PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO PARA OBTENÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE <i>Prochilodus lineatus</i> . Incubação dos fragmentos de testículos em Shaker.	49
FIGURA 11 – OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO E <i>PELLET</i> CELULAR DOS TESTÍCULOS DE <i>P. lineatus</i>	50
FIGURA 12 – PREPARAÇÃO DO GRADIENTE DE PERCOLL.	51
FIGURA 13 – ORGANIZAÇÃO ANATÔMICA E MORFOLÓGICA DOS TESTÍCULOS DE <i>Prochilodus lineatus</i>	63
FIGURA 14 – ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS TESTÍCULOS DE <i>Prochilodus lineatus</i>	64
FIGURA 15 – ESPERMATOGÔNIAS DE <i>Prochilodus lineatus</i>	65
FIGURA 16 – DIFERENTES ESTÁGIOS DE ESPERMATÓCITOS OBSERVADOS DURANTE O PROCESSO MEIÓTICO EM <i>Prochilodus lineatus</i>	66
FIGURA 17 – ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE ESPERMÁTIDES A ESPERMATOZOIDES DURANTE A ESPERMIOGÊNESE EM <i>P. Lineatus</i>	67

FIGURA 18 – PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA DOS COMPONENTES DOS COMPARTIMENTOS TUBULAR E INTERTUBULAR NAS REGIÕES ANTERIOR, MÉDIA E POSTERIOR NOS TESTÍCULOS DE <i>P. lineatus</i>	68
FIGURA 19 – VARIAÇÃO DO DIÂMETRO NUCLEAR DAS CÉLULAS GERMINATIVAS NOS TESTÍCULOS DE <i>P. lineatus</i>	70
FIGURA 20 – ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS TESTÍCULOS DE <i>P. lineatus</i>	71
FIGURA 21 – IMUNOPEROXIDASE COM ANTI- GFR α 1 NOS TESTÍCULOS DE <i>Prochilodus lineatus</i>	72
FIGURA 22 – IMUNOPEROXIDASE COM ANTI-VASA NOS TESTÍCULOS DE <i>Prochilodus lineatus</i>	73
FIGURA 23 – SEPARAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS DE <i>Prochilodus lineatus</i> EM GRADIENTE DE PERCOLL.	74
FIGURA 24 – PLAQUEAMENTO DIFERENCIAL POR ADESÃO DE CÉLULAS TESTICULARES DE <i>Prochilodus lineatus</i>	76
FIGURA 25 – CULTIVO PRIMÁRIO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE <i>Prochilodus lineatus</i> COM MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR COM TROCA DO MEIO DE CULTURA.	79
FIGURA 26 – CULTIVO PRIMÁRIO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE <i>Prochilodus lineatus</i> COM MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR E SEM TROCA DO MEIO DE CULTURA.	80
FIGURA 27 - CULTIVO PRIMÁRIO DE 8 DIAS DAS CÉLULAS CULTIVADAS COM MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR, TRATADAS COM EEPI E SEM EEPI.	82
FIGURA 28 - CULTIVO PRIMÁRIO DE 15 DIAS DAS CÉLULAS CULTIVADAS COM MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR, TRATADAS COM EEPI, COM E SEM TROCA DO MEIO DE CULTURA.	83
FIGURA 29 - CULTIVO PRIMÁRIO DE 15 DIAS DAS CÉLULAS CULTIVADAS COM MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR, NÃO TRATADAS COM EEPI, COM E SEM TROCA DO MEIO DE CULTURA.	84
FIGURA 30 - MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM O ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-VASA DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 8 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR HAVENDO TROCA DO MEIO DE CULTURA.	86

FIGURA 31 - MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM O ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-GFR α 1 DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 3 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR HAVENDO TROCA DO MEIO DE CULTURA.	87
FIGURA 32 - MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM O ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-OCT4 DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 15 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR SEM TROCA DO MEIO DE CULTURA.	88
FIGURA 33 - MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM O ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-VASA DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 8 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR SEM O EXTRATO EMBRIONÁRIO DE <i>Prochilodus lineatus</i>	89
FIGURA 34 - DUPLA MARCAÇÃO PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM OS ANTICORPOS PRIMÁRIOS ANTI-VASA/OCT4 DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 8 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR SEM O EXTRATO EMBRIONÁRIO DE <i>Prochilodus lineatus</i>	90
FIGURA 35 – VISUALIZAÇÃO DAS CÉLULAS COM 12 HORAS DE CULTIVO, ANTES DA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.	91
FIGURA 36 – POPULAÇÕES CELULARES ORIUNDAS DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA, SEM O PERCOLL E QUE FORAM SEPARADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.	92
FIGURA 37 – MORFOLOGIA DAS QUATRO POPULAÇÕES CELULARES SEPARADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO, ORIUNDAS DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA, SEM O PERCOLL.	93
FIGURA 38 – MORFOLOGIA DA P4 “RESTRITA” SEPARADA POR CITOMETRIA DE FLUXO, ORIUNDA DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA, SEM PERCOLL.	93
FIGURA 39 – POPULAÇÕES CELULARES ORIUNDAS DAS DUAS CAMADAS SUPERIORES DA COLUNA DE PERCOLL (CAMADAS 1 E 2) E QUE FORAM SEPARADAS PELO CITÔMETRO DE FLUXO.	94
FIGURA 40 – MORFOLOGIA DAS QUATRO POPULAÇÕES CELULARES SEPARADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO (P2, P3, P4 E P5), ORIUNDAS DAS DUAS CAMADAS SUPERIORES DA COLUNA DE PERCOLL.	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Meios de cultura utilizados e resumo das principais etapas realizadas durante a cultivo primário das espermatogônias primárias de <i>Prochilodus lineatus</i>	55
TABELA 2 – Percentual volumétrico médio ($\pm$ erro padrão da média) do compartimento tubular e dos componentes do compartimento tubular das regiões anterior, média e posterior dos testículos de <i>P. lineatus</i>	69
TABELA 3 – Percentual volumétrico médio ($\pm$ erro padrão da média) do compartimento intertubular e dos componentes do compartimento intertubular das regiões anterior, média e posterior dos testículos de <i>P. lineatus</i>	69
TABELA 4 – Morfometria e estereologia da espermatogônia primária em <i>Prochilodus lineatus</i>	71
TABELA 5 – Resumo do cultivo primário das células de <i>Prochilodus lineatus</i> com meio de cultura para proliferação celular.	78
TABELA 6 – Resumo do cultivo primário das células de <i>Prochilodus lineatus</i> com meio de cultura para diferenciação celular.	82
TABELA 7 – Pureza e número de células obtidos nas diferentes populações celulares oriundas da digestão enzimática, sem o Percoll, após a separação por citometria de fluxo.	92
TABELA 8 – Pureza e número de células obtidos nas diferentes populações celulares oriundas do Percoll após a separação por citometria de fluxo.	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Os peixes e a aquicultura	22
2.2 O processo reprodutivo e a espermatogênese em teleósteos	24
2.3 Espermatogônias primárias e suas técnicas de isolamento.....	28
2.4 Imunomarcadores de espermatogônias primárias	30
2.5 Estudo <i>in vitro</i> das espermatogônias primárias em teleósteos.....	32
2.6 Material biológico	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
3.2.1 Caracterizar morfológicamente os testículos e as espermatogônias.	36
3.2.2 Analisar morfométrica e estereologicamente os testículos.	36
3.2.3 Determinar a fase e a subfase reprodutiva nos testículos.....	37
3.2.4 Cultivo primário das espermatogônias primárias.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.2 Coleta e fixação dos testículos.....	38
4.3 Processamento das amostras de testículos para análise morfológica, ultraestrutural e morfométrica	39
4.4 Caracterização morfológica e ultraestrutural dos testículos e das espermatogônias primárias	39
4.5 Morfometria das células germinativas e de Leydig.....	40
4.6 Análise estereológica dos componentes testiculares	40
4.7 Análise estereológica e morfométrica das espermatogônias primárias.....	42
4.8 Análise estatística.....	43
4.9 Avaliação da fase e da subfase reprodutiva nos testículos utilizados nas análises morfométrica e estereológica	44
4.10 Imunoperoxidase com anti-OCT4, anti-GFR α 1 e anti-Vasa aplicada aos testículos	44
4.11 Obtenção e isolamento das espermatogônias primárias	45

4.11.1 Aclimação laboratorial dos exemplares de <i>Prochilodus lineatus</i>	45
4.11.3 Separação e seleção das células germinativas.....	51
4.12 Plaqueamento diferencial por adesão das células germinativas após centrifugação com Percoll.....	52
4.13 Cultivo primário das espermatogônias primárias.....	53
4.14 Método de imunofluorescência das células cultivadas	56
4.15 Separação das espermatogônias primárias por citometria de fluxo – <i>Cell sorting</i> ...	56
5 RESULTADOS	59
5.1 Caracterização morfológica dos testículos	59
5.2 Aspectos morfológicos e morfométricos	60
5.2 Análise estereológica dos componentes testiculares	68
5.3 Análise estatística do diâmetro nuclear das células germinativas estimado durante a espermatogênese	69
5.4 Análises morfométrica e estereológica da espermatogônia primária	70
5.5 Determinação da fase e da subfase reprodutiva nos testículos usados nas análises morfométrica e estereológica	71
5.6 Imunoperoxidase com anti-OCT4, anti-GFR α 1 e anti-Vasa aplicada aos testículos.	72
5.7 Método de obtenção das espermatogônias primárias	73
5.8 Plaqueamento diferencial por adesão das células germinativas após Percoll.....	75
5.9 Cultivo primário das espermatogônias primárias.....	76
5.10 Método de imunofluorescência das células cultivadas	84
5.11 Separação das espermatogônias primárias por citometria de fluxo – <i>Cell sorting</i> ...	90
6 DISCUSSÃO	96
6.1 Caracterização dos testículos e dos compartimentos tubular e intertubular	96
6.2 Determinação da fase e da subfase reprodutiva nos testículos usados nas análises morfométrica e estereológica	102
6.3 Análise estereológica dos componentes testiculares	103
6.4 Análise estereológica e morfométrica da espermatogônia primária.....	105
6.5 Método imuno-histoquímico aplicado aos testículos	108
6.6 Obtenção, isolamento e cultivo das espermatogônias primárias.....	109
7 CONCLUSÃO.....	120
REFERÊNCIAS*.....	122

ANEXOS.....	131
ANEXO I: PREPARO DE SOLUÇÕES	132
ANEXO II: PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE TESTÍCULOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ (M.L.) E IMUNO-HISTOQUÍMICA	137
ANEXO III: PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO DOS CORTES DE TECIDOS	139
PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO DOS CORTES DE TECIDOS COM HEMATOXILINA/EOSINA	139
PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO DOS CORTES DE TECIDOS COM P.A.S. + HEMATOXILINA FÉRRICA + METANIL <i>YELLOW</i> EM GLICOL METACRILATO.....	140
ANEXO IV: PROCESSAMENTO ULTRAESTRUTURAL DAS AMOSTRAS DE TESTÍCULOS - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (M.E.T.).....	141
ANEXO V: PROTOCOLO DE SUPLEMENTAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADO NA OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS	142
ANEXO VI: PREPARO DO SORO DE <i>Prochilodus lineatus</i>.....	143
ANEXO VII: Preparo do Extrato Embrionário de <i>Prochilodus lineatus</i>	144

1 INTRODUÇÃO

A proposta em questão teve como objetivo principal identificar e caracterizar as espermatogônias de *Prochilodus lineatus*, e padronizar métodos que permitam isolar as espermatogônias primárias de peixes doadores para, posteriormente, manter estas células em cultivo, com a possibilidade futura de se produzir células mais diferenciadas *in vitro*, e utilizar estas células em programas de reprodução artificial. Esta abordagem, além do mérito científico, pode ser vinculada à preservação da diversidade biológica, assim como pode ser de grande interesse sócio-econômico, considerando especialmente as estações de piscicultura que reproduzem artificialmente espécie de importância comercial. Essa técnica, quando implementada nestas situações, pode ser extremamente vantajosa, pois todos os animais doadores em potencial, incluindo juvenis e adultos, possuem espermatogônias primárias permanentemente em seus testículos, e, desta forma, a obtenção das mesmas pode ocorrer em qualquer época do ano.

A potencialização da produção de espermatogônias primárias, de células germinativas mais diferenciadas e da reprodução de espécies ameaçadas de extinção poderia substituir o transplante de células germinativas, permitindo o mesmo resultado *in vitro* com várias vantagens, a começar pela drástica redução no uso de animais a serem manipulados. Um contínuo suprimento de espermatogônias requer a criação de um grande número de peixes doadores em cativeiro. Isto poderia ser superado pelo desenvolvimento de um sistema de cultura *in vitro* que permite que a espermatogônia se multiplique e seja mantida por longos períodos.

O maior sucesso da técnica de cultivo de células germinativas requer a obtenção de populações celulares ricas em espermatogônias, pois, dentre as diversas células do processo espermatogênico que podem ser coletadas nos túbulos seminíferos, e eventualmente se diferenciar, apenas as espermatogônias primárias têm a capacidade de se auto-renovar e de formar continuamente células germinativas mais maduras (BRINSTER; AVARBOCK, 1994).

A padronização desta metodologia foi realizada utilizando-se o curimatá, *Prochilodus lineatus*, como espécie doadora, por esta ser uma espécie nativa da América do Sul, rústica, de fácil obtenção e manejo, e com a possibilidade de ser obtida em número suficiente para a realização da pesquisa. Além disso, esta espécie é de piracema, e, desta forma, a desova não ocorre sem indução em animais de cultivo, o que corrobora com a escolha da espécie pela possibilidade da mesma ser beneficiada no futuro com os resultados da pesquisa.

Estudos atuais relacionados com a proposta deste trabalho, foram realizados, até onde se saiba, com duas espécies, o peixe medaka (*Oryzias latipes*) (HONG et al., 2004), encontrado no hemisfério Norte e nativo do Sudeste Asiático, e a carpa indiana rohu (*Labeo rohita*) (PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011). Estas espécies não são peixes migradores. Em contrapartida, a metade do número de espécies do hemisfério Sul é de piracema. No presente trabalho, a exposição resumida de fatores que levam a um custo alto na produção de espécies nativas de água doce mostra a importância de seu papel na economia do hemisfério Sul.

Avaliações histológicas, morfométricas e estereológicas são ferramentas adequadas para se ter um melhor entendimento da estrutura testicular, do processo espermatogênico e da função dos testículos em peixes (ALVARENGA; FRANÇA, 2009; LEAL et al., 2009; SCHULZ et al., 2005). Estas ferramentas permitem estimar o diâmetro nuclear de espermatogônias primárias até espermatozoides, fornecendo informação sobre a evolução nuclear durante o processo espermatogênico; determinar a proporção volumétrica dos componentes testiculares entre diferentes regiões dos testículos, fornecendo informação no padrão de distribuição destes componentes ao longo do comprimento deste órgão; e determinar o número de espermatogônias primárias por testículo.

Desta forma, os dados obtidos pelas análises morfométrica e estereológica servirão para aprimorar o nosso conhecimento sobre a biologia dos testículos e das espermatogônias primárias de *P. lineatus*. Além disso, há uma escassez de estudos morfológicos e morfométricos disponíveis na literatura quanto à estrutura testicular desta espécie e de outros Characiformes. Portanto, os resultados desta análise contribuirão para um melhor entendimento morfofuncional dos testículos desta ordem, e poderão servir de parâmetro para outros estudos correlacionados.

Partindo do exposto, algumas importantes ferramentas emergem como incremento para a padronização de técnicas que permitam a futura obtenção de espermatozoides *in vitro* de peixes para serem utilizados em espécies ameaçadas de extinção e/ou de importância comercial: a identificação, o isolamento e o cultivo apropriados das espermatogônias primárias e a análise do seu processo de diferenciação. Além disso, estas ferramentas são essenciais para uma variedade de estudos, principalmente, quando se visa o estabelecimento de sistemas de cultura de espermatogônias primárias (tronco) que poderia oferecer um melhor entendimento do comportamento da proliferação, autorrenovação e diferenciação dessas células.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os peixes e a aquicultura

Os peixes em geral são os representantes mais numerosos e diversos entre os vertebrados, contando com aproximadamente 50% deste grupo (MOYLE; CECH, 2003; NELSON, 2006). São conhecidas cerca de 28000 espécies viventes de peixes que ocupam os mais diversos ambientes aquáticos, ocorrendo desde as altas altitudes até as fossas submarinas dos oceanos. Em relação à sua distribuição, 58% são marinhos, 41% dulciaquícolas e 1% vivem entre esses dois ambientes, ou seja, essas espécies realizam migrações entre o ambiente marinho e o de água doce (WOOTON, 1990). Além da importância como fonte alternativa de alimento, os peixes também constituem uma rica fonte de material biológico, podendo ser utilizados como modelos para entender os controles dos processos biológicos (BLÁZQUEZ et al., 1998). Essa grande diversidade da ictiofauna existente no mundo vem despertando interesse em vários ramos da atividade, não só da comunidade científica, mas também de empresas ligadas à piscicultura, turismo (pesca esportiva), ecoturismo, entidades envolvidas com a preservação da diversidade, entre outras.

Além de servir como fornecedora de alimento saudável e de alto teor protéico, a aquicultura brasileira possui grande importância na preservação das espécies ameaçadas de extinção, devido ao cultivo dessas espécies em cativeiro e, posteriormente, na instalação de programas de repovoamento em áreas impactadas. Ao analisar a Lista Nacional das Espécies de Animais Ameaçadas de Extinção (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008), pode-se constatar a presença de várias espécies de peixes em situações críticas, sendo que uma inversão nesse quadro só será possível por meio de programas adequados de repovoamento, que só podem atingir algum sucesso quando as técnicas de reprodução e produção forem dominadas.

A poluição que atinge os ambientes aquáticos nos últimos anos vem afetando diretamente as populações de espécies nativas de peixes. Além disso, as mudanças climáticas recentemente intensificadas pela emissão de gases na atmosfera, certamente terão efeito na perda de algumas populações de peixes que não são adaptáveis às temperaturas mais quentes das águas. A redução no número de indivíduos de uma determinada população reduz também a sua variabilidade genética, fazendo com que sua capacidade de adaptação a novos ambientes seja diminuída (CARNEIRO, 2007).

O declínio dos estoques pesqueiros de águas interiores no Brasil decorre, principalmente, das alterações das condições naturais de reprodução e de desenvolvimento dos peixes devido a uma série de intervenções antrópicas, dentre as quais destacam-se: a pesca extrativa desordenada, a poluição dos rios desencadeada pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, pelas poluições industrial e doméstica e pelo garimpo, o uso conflitante da água, a construção de barragens e reservatórios, o desmatamento ciliar, além da introdução de espécies exóticas (CARNEIRO, 2007; FAO, 2006).

Neste contexto, a aquicultura mundial, quando bem conduzida, representa o melhor caminho para preservar os organismos aquáticos, podendo suprir, ainda, a demanda crescente de fonte alimentar devido ao crescimento populacional descontrolado, obrigando o homem a procurar recursos alimentares alternativos para sanar os problemas relacionados à fome. Levando-se em consideração a produção mundial, os peixes constituem o principal grupo de organismos aquáticos cultivados, com 80-85% da produção, seguidos pelos camarões marinhos e moluscos (GODINHO, 2007).

A fauna de peixes de água doce do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies, existindo ainda muitas não catalogadas. Pelo menos 40 espécies de várias famílias e gêneros são utilizadas ou apresentam potencial para aquicultura, muitas delas com caráter migrador, como por exemplo, o *Prochilodus lineatus* (curimbatá), o *Piaractus mesopotamicus* (pacu), o *Salminus maxillosus* (dourado), o *Rhamdia quelen* (jundiá) e o *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) (GODINHO, 2007).

No Brasil, grande parte dos peixes dulciaquícolas de valor comercial é representada pelas espécies migradoras (reofílicas), ou seja, peixes que durante um determinado período (que pode variar entre as espécies) realizam migrações ao longo do rio e vencem obstáculos naturais (corredeiras e cachoeiras) para reproduzir (LUCAS; BARAS, 2001). A migração é necessária para a desova (AGOSTINHO et al., 2003), e o sucesso reprodutivo em espécies migradoras fica prejudicado quando estes animais são impedidos de migrar. Esse problema ocorre frequentemente em decorrência de bloqueios no percurso natural dos rios, como a construção de barragens para aproveitamento hidrelétrico e abastecimento público, ou no confinamento em viveiros de cultivo, criando empecilhos à migração reprodutiva dos peixes.

2.2 O processo reprodutivo e a espermatogênese em teleósteos

Sabe-se que o sucesso reprodutivo no cultivo de uma espécie só é obtido com o conhecimento científico acerca de sua biologia, especialmente da biologia reprodutiva. A reprodução natural em peixes é modulada por fatores ambientais como, por exemplo, a temperatura, o fotoperíodo nas espécies de clima temperado, e, possivelmente, a temperatura e as chuvas nas espécies de clima tropical. Estes fatores controlam o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, estimulando a síntese e liberação de gonadotropinas, esteróides gonadais e hormônios moduladores do processo reprodutivo (AGUILLEIRO; GARCIA-HERNÁNDEZ; GARCÍA-AYALA, 2006; TAKEI; LORETZ, 2006). Desta forma, a reprodução ocorre naturalmente com o desenvolvimento das gônadas, maturação, liberação e fertilização dos gametas, sendo que, em peixes, geralmente a fertilização ocorre no ambiente externo (ROCHA, M.; ROCHA, E., 2006; TYLER; SUMPTER, 1996).

Os testículos de peixes apresentam grande variação morfológica em relação à sua anatomia. Entretanto, em teleósteos que apresentam fecundação externa, em geral, os testículos são estruturas pares, alongadas, presos na parede abdominal pelo mesórquio e unindo-se na extremidade caudal para formar um único ducto espermático, o qual se abre na papila urogenital, por onde o sêmen é eliminado (EVANS; CLAIBORNE, 2006; NAGAHAMA, 1983).

Os testículos dos teleósteos, assim como o dos amniotas, são revestidos externamente pela túnica albugínea, a qual emite septos de tecido conjuntivo para o interior do órgão, dividindo-o em dois compartimentos, o intersticial e o germinativo. Os espaços intersticiais, localizados entre os túbulos seminíferos, contêm vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos e outras células do tecido conjuntivo. Contém também células de Leydig, de origem somática, sendo esta a principal fonte de produção de esteróides nos testículos (EVANS; CLAIBORNE, 2006; NAGAHAMA, 1983).

O compartimento germinativo, formado pelos túbulos seminíferos, é composto de dois grupos de células: as germinativas e as somáticas. As células somáticas são as células de Sertoli, que contornam a periferia do túbulo e são envolvidas por uma membrana basal. Essas células formam o espermatocisto, ou cisto, a unidade funcional e estrutural do túbulo seminífero, sendo que o desenvolvimento das células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) se realiza dentro dessa unidade (GRIER, 2002; NAGAHAMA, 1983).

Nos testículos dos vertebrados amniotas (répteis, aves e mamíferos), considera-se que as células de Sertoli proliferam até a puberdade, quando existem apenas espermatogônias e poucos espermatócitos primários no epitélio germinativo. Por este motivo, os testículos desses animais adultos contém um número fixo de células de Sertoli “imortais” que sustentam as sucessivas oscilações da espermatogênese. Durante essas oscilações, uma determinada célula de Sertoli dá suporte, ao mesmo tempo, a diferentes estágios de desenvolvimento das células germinativas, isto é, células pertencentes a diferentes clones. Assim, a base da célula de Sertoli mantém contato com a espermatogônia, enquanto a parte lateral com espermatócitos e espermátides iniciais, e a parte adluminal com espermátides avançadas (FIGURA 1) (PUDNEY, 1995; SCHULZ et al., 2010).

FIGURA 1 - TESTÍCULO DE MAMÍFEROS. Um segmento de túbulo espermatogênico é apresentado para ilustrar as diferenças na relação célula de Sertoli/células germinativas da espermatogênese não cística. O epitélio germinativo contém Sertoli (SE) e células germinativas, delineados por uma lâmina basal (BL) e células mióides peritubulares (MY). As células intersticiais de Leydig (LE) e vasos sanguíneos (BV) são mostrados. Espermatogônias (SG); espermatócitos (SC); espermátides redondas (RST); e espermátide alongada (EST). Adaptado de Schulz et al. (2010).

Em vertebrados anamniotas (peixes e anfíbios) a unidade da espermatogênese é um espermatocisto que contém células germinativas no mesmo estágio de desenvolvimento, e as

células de Sertoli que formam estes cistos permanecem com capacidade de proliferação também nos peixes adultos, sendo que após a espermição, as células de Sertoli estão sujeitas à degeneração (FIGURA 2) (PUDNEY, 1995; SCHULZ et al., 2010).

FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DO ARRANJO CÍSTICO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DOS TELEÓSTEOS. As células germinativas (SGA, SGB, SC) se desenvolvem de forma sincrônica devido à presença de pontes citoplasmáticas (cabeças de seta). A espermatogênese ocorre no interior dos cistos, que são formados quando uma espermatogônia isolada (SGA) é envolvida pelos prolongamentos (asteriscos) das células de Sertoli (SE). Ao final do processo, os espermatozoides (SZ) atingem o lúmen do túbulo seminífero (L) através da espermição (abertura dos cistos) (seta). GC: compartimento tubular, BL: membrana basal, MY: células peritubulares mióides, IC: compartimento intertubular, LE: células de Leydig, BV: vaso sanguíneo. Adaptado de Nóbrega; Batlouni e França (2009).

Os processos de desenvolvimento das células germinativas em peixes durante a espermatogênese é similar em todos os vertebrados, assim como o uso da mesma nomenclatura é requerido para os mesmos tipos celulares (SCHULZ et al., 2010). Na maioria das espécies de teleostes, o processo espermatogênico tem início quando células de Sertoli envolvem a espermatogônia primária (FIGURA 3) (GRIER, 1993; PUDNEY, 1995), também chamada de espermatogônia do tipo A indiferenciada e classicamente considerada como célula-tronco (SCHULZ et al., 2010). As células germinativas derivadas desta espermatogônia primária dividem-se sincronicamente numerosas vezes por mitose para produzir um número de

gerações de espermatogônias diferenciadas; este número pode variar entre as espécies e é muito mais alto em comparação com mamíferos (PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011; SCHULZ et al., 2010). O cisto agora é composto de uma massa de células germinativas envolvida pelo citoplasma das células de Sertoli, que formam a parede do cisto (PUDNEY, 1995). As espermatogônias diferenciadas, após passarem pela mitose final, diferenciam em espermatócitos primários (pré-leptóteno), de onde os seguintes estágios de desenvolvimento são: espermatócitos primários (I divisão meiótica) e espermatócitos secundários (II divisão meiótica) (SCHULZ et al., 2010). Na fase meiótica ou espermatocitária, o material genético é duplicado, recombinação e segregado (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009). Após as duas divisões meióticas, as células germinativas desenvolvem-se em espermatídes (diferenciação sem proliferação) (SCHULZ et al., 2010). As células germinativas constituem um clone de células que é envolvido por um número variado de células de Sertoli, dependendo do tipo de cisto (espermatogonial, espermatocitário ou de espermatídes) (VILELA et al., 2003). O processo espermatogênico é contínuo e envolve duas divisões celulares sucessivas, resultando na produção de quatro espermatídes haplóides. Essas células iniciam uma transformação morfológica chamada de espermiogênese e tornam-se espermatozoides (GRIER, 2002; NAGAHAMA, 1983; NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009; PUDNEY, 1995; SCHULZ et al., 2010) (FIGURA 1).

FIGURA 3 - ETAPAS DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO EM TELEÓSTEOS. Um segmento de túbulo espermatogênico é apresentado para ilustrar as etapas do processo da espermatogênese não cística. O epitélio germinativo contém Sertoli (SE) e células germinativas, delineados por uma lâmina basal (BL) e células mióides peritubulares (MY). As células intersticiais de Leydig (LE) e vasos sanguíneos (BV) são mostrados. Espermatogônias indiferenciadas tipo A * (Aund *) (possíveis células-tronco); espermatogônias indiferenciadas tipo A (Aund); espermatogônias diferenciadas tipo A (Adiff); espermatogônias tipo B [B (early-final)]; espermatócitos primários leptotênicos/zigotênicos (L/Z); espermatócitos primários paquítenicos (P); espermatócitos diplotênicos / metáfase I (D / MI); espermatócitos secundários / metáfase II (S / MII); espermátides iniciais (E1), intermediárias (E2) e finais (E3); espermatozoides (SZ). Adaptado de Schulz et al. (2010).

2.3 Espermatogônias primárias e suas técnicas de isolamento

As espermatogônias primárias são células grandes, com núcleo grande com cromatina esparsa e membrana nuclear distinta, contendo um ou dois nucléolos proeminentes. Análises ultra-estruturais dessas células revelaram a presença de *nuage*, uma agregação de RNAs e proteínas, que aparece como inclusões citoplasmáticas elétrons densas, frequentemente observadas em associação com mitocôndrias. Representam um estoque de RNA e proteínas que pode ser necessário para a diferenciação e/ou determinação das espermatogônias primárias. A presença de *nuage* é uma característica geral das espermatogônias primárias de peixes (BRAAT; SPEKSNIJDER; ZIVKOVIC, 1999).

As espermatogônias tipo A indiferenciadas (desde isoladas até 8 células) são tidas como células-tronco espermatogoniais porque elas são capazes de colonizar e restabelecer o processo de espermatogênese seguido do transplante nos testículos de camundongos deficientes na espermatogênese (DE ROOIJ; OKABE; NISHIMUNE, 1999; TOLKUNOVA et al., 2009). Um estudo mostrou que as células tronco espermatogoniais podem ser valiosas para a terapia de substituição de tecido em humanos, e que as células tronco espermatogoniais de camundongos cultivadas podem transformar em células pluripotentes que são funcionalmente similares às células tronco embrionárias (KANATSU-SHINOHARA et al., 2004).

As células germinativas, incluindo as espermatogônias primárias, têm atraído considerável interesse no desenvolvimento de culturas de células tronco da linhagem germinativa. Entretanto, é necessária a realização de um primeiro passo para se obter estas células, o isolamento a partir dos testículos intactos e, posteriormente, o uso das espermatogônias isoladas e/ou purificadas em várias etapas que envolvem biotecnologia, como o transplante e o cultivo *in vitro*, técnicas que atualmente vêm sendo implementadas nas pesquisas.

Vários métodos foram utilizados para isolar e/ou purificar as espermatogônias primárias. Foi observado que com a utilização da centrifugação com Percoll, maior quantidade de espermatogônias tronco esteve presente na população de células espermatogoniais selecionadas (KHAIRA et al., 2005). Lacerda et al. (2006, 2013), separaram e selecionaram as espermatogônias mais imaturas para o transplante por meio do método de centrifugação com Percoll e poucas células de Sertoli, mióides peritubulares e de Leydig estiveram presentes no *pool* de células germinativas selecionadas. Panda, Barman e Mohapatra (2011) realizaram o isolamento das espermatogônias tronco dos testículos da carpa, *Labeo rohita*, usando digestão enzimática seguida por dois passos de purificação: centrifugação por gradiente de Ficoll seguido pelo MACS (*Magnetic activated cell sorting*).

Mais recentemente, Kise et al. (2012) estabeleceram uma estratégia de purificar as espermatogônias tronco dos testículos de várias espécies de teleósteos baseada nas características morfológicas, sem o uso de marcadores ou transgênese. Os autores utilizaram a citometria de fluxo e padrões de tamanho e granularidade das espermatogônias tronco para purificá-las, obtendo uma excelente taxa de pureza.

Estudos realizados com transplantes de células germinativas em peixes (LACERDA et al., 2008; NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009) permitiram isolar espermatogônias indiferenciadas de um animal doador e transplantá-las para os testículos de um animal receptor, dando origem a espermatozoides maduros com as características genéticas do doador

(NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009). Estudos como estes oferecem oportunidade para a biotecnologia e fornecem possibilidades importantes para a preservação de estoques genéticos de animais de importância comercial e/ou de espécies ameaçadas de extinção; contudo, é necessária a utilização e manipulação de animais doadores em número grande o suficiente para se obter um contínuo suprimento de espermatogônias indiferenciadas.

Até a presente data, pouco é conhecido sobre a biologia das espermatogônias primárias em vertebrados não mamíferos, incluindo os peixes e, além disso, devido à disponibilidade limitada e uma difícil acessibilidade destas células, as propriedades fisiológicas são ainda pobremente entendidas. Nesse contexto, a identificação apropriada e o isolamento das espermatogônias primárias são essenciais para melhor entender o comportamento de proliferação e diferenciação destas células após serem cultivadas, porém estes fatores têm sido limitados pela falta de marcadores específicos para estas células.

2.4 Imunomarcadores de espermatogônias primárias

Em mamíferos, vários marcadores como o GFR α 1, PLZF e CSF1R, vem sendo caracterizados para identificar as espermatogônias primárias em equídeos (COSTA et al., 2012), o OCT4, GFR α 1, ITGA6, UCHL1, GPR125, PLZF, NANOS2 e THY1 em roedores (HE et al., 2010; KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2003), e em humanos o CD24⁺, THY-1⁺, α V-INTEGRINA⁻, C-KIT⁻, MHC-I⁻ e CD9⁺ (KHAIRA et al., 2005).

Ao contrário, poucos estudos visam a caracterização destes marcadores em peixes. Embora alguns candidatos tenham sido propostos, como o GFR α 1, NANOS2, PLZF, OCT4 e THY-1 (LACERDA et al., 2013; LACERDA; COSTA; FRANÇA, 2014; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011), marcadores moleculares específicos e únicos para as espermatogônias primárias de peixes não são conhecidos ainda, e estas células vêm sendo caracterizadas principalmente pelos critérios morfológicos (LACERDA; COSTA; FRANÇA, 2014; NÓBREGA et al., 2010; SCHULZ; MIURA, 2002). A descoberta e o estabelecimento de novos marcadores de células testiculares em peixes permitirão mais avanços no entendimento da fisiologia das espermatogônias primárias.

O PLZF, caracterizado como "dedo de zinco de leucemia promielocítica", é um fator de transcrição que tem função chave na manutenção da autorrenovação das células-tronco dos testículos da carpa, *Labeo rohita*, e foi expresso na cultura primária de células espermatogoniais desta espécie (PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011). O OCT4, também conhecido como Pou5f1, é um fator de transcrição de células germinativas contendo o

domínio POU V, considerado um marcador de células-tronco multifuncional (PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011). Foi observado que o OCT4 foi expresso especificamente nas células germinativas primordiais de camundongo, na espermatogônia tipo A e nas células-tronco embrionárias indiferenciadas (HONG et al., 2004). O C-KIT, um marcador de células germinativas, é um receptor da tirosina kinase que nos testículos de camundongo adultos é altamente expresso pela espermatogônia e espermatócitos (HONG et al., 2004). O THY-1, que é um fosfatidilinositol glicosil ancorado à glicoproteína da superfamília Ig, e o GFR α 1, que é um receptor da família do GDNF (fator neurotrófico derivado da linhagem celular glial) das células-tronco espermatogoniais indiferenciadas, estão ambos localizados na membrana plasmática das células-tronco espermatogoniais (COSTA et al., 2012; HE et al., 2010; KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2004; LACERDA et al., 2013; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011) e sugere-se serem conservados em eucariotos (PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011). O GDNF é um importante fator de crescimento, secretado pelas células de Sertoli, essencial para a proliferação e autorrenovação das células-tronco espermatogoniais (CAIRES; BROADY; MCLEAN, 2010; HULEIHEL; ABUELHIJA; LUNENFELD, 2007; LACERDA et al., 2013), *in vivo* e *in vitro* (HULEIHEL; ABUELHIJA; LUNENFELD, 2007). NANOS2 é um regulador de células-tronco chave que é expresso nas células-tronco espermatogoniais em autorrenovação. Em peixes, a proteína NANOS2 foi demonstrada nas células germinativas primordiais de zebrafish, *Danio rerio*, nos estágios iniciais da diferenciação sexual e em medaka, *Oryzias latipes*, na espermatogônia e oogônia (LACERDA et al., 2013).

2.5 Estudo *in vitro* das espermatogônias primárias em teleósteos

Em vertebrados basais como os peixes, o cultivo de células espermatogênicas tem sido limitado ao sistema de cultura primária (HONG et al., 2004; KAWASAKI et al., 2012; LACERDA et al., 2013; MIURA et al., 1991; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011; SAKAI, 2002). Lacerda et al., (2013), cultivaram as espermatogônias tronco de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, e mantiveram estas células em alta confluência sem subcultivo durante 26 dias, para investigar o comportamento das mesmas no sistema de cultura. As espermatogônias geraram grandes colônias e, analisando a identidade destas colônias por imunofluorescência, observaram que estas expressaram Vasa, GFR α 1 e OCT4, marcadores de células germinativas, tronco espermatogoniais e tronco pluripotentes, respectivamente.

Shikina, Ihara e Yoshizaki (2008) reportaram a otimização das condições de cultura para manter a sobrevivência e proliferação das espermatogônias *in vitro* para o transplante. O efeito de vários fatores solúveis foram testados no cultivo para determinar as condições de cultura que permitiriam a espermatogônia proliferar por longos períodos. Usando estas condições melhoradas, as espermatogônias sobreviveram por mais de um mês em cultura com níveis alto de atividade mitótica. Estas células foram capazes também de colonizar e proliferar nas gônadas receptoras, quando transplantadas na cavidade peritonal de embriões de truta, *Oncorhynchus mykiss*.

O uso das células tronco da linhagem germinativa (espermatogônias tronco) de zebrafish, *Danio rerio*, foi descrito por Kawasaki et al. (2012). Os autores utilizaram estas células em condições de cultura de longa duração para propagá-las e utilizá-las na produção de prole, após sua diferenciação em cultura. Os resultados mostraram que as células espermatogoniais inicialmente proliferaram, formando aglomerados celulares aderidos nas células somáticas, e mantiveram as propriedades de células germinativas, com marcação do anti-vasa, por cerca de um mês. Em seguida, estas células foram transplantadas e se diferenciaram em espermatogônias do tipo B, espermatócitos, e finalmente em espermatozoides funcionais. A prole produzida destas espermatogônias foi completamente normal e fértil.

A determinação da influência de eliminar as células somáticas no cultivo com as espermatogônias primárias usando trutas, *Oncorhynchus mykiss*, imaturas foi um estudo realizado por Shikina, Ihara e Yoshizaki (2008). O autores observaram que, as células somáticas se proliferaram rapidamente e as espermatogônias desapareceram no cultivo dentro de poucas semanas. Estas descobertas sugerem que o supercrescimento das células somáticas

inibiu a sobrevivência e proliferação da espermatogônia. As células foram enriquecidas pelo plaqueamento diferencial por adesão, método que permitiu as células somáticas aderir na placa de cultura e o cultivo das células em suspensão, ricas em espermatogônias, permitiu que as espermatogônias se proliferassem e formassem grandes aglomerados celulares.

Espermatogônias primárias, definidas sob o ponto de vista funcional como as células do epitélio seminífero que são capazes de diferenciação e autorrenovação, também podem ser utilizadas para formação de espermatozoides *in vitro* (HONG et al., 2004; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011). O processo de formação *in vitro* de espermatogônias secundárias e de espermatozoides a partir de espermatogônias primárias pode ser utilizado para uma contínua geração de sêmen às pisciculturas, principalmente em espécies importantes que produzem pouco espermatozoide (como o pirarucu, *Arapaima gigas*, por exemplo) ou que às vezes precisam ser sacrificadas para obtenção de sêmen (como, por exemplo, o piau, *Leporinus freiderici*, e o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*). Esse processo pode substituir o transplante com grande vantagem, a começar pela ausência do procedimento cirúrgico (transplante), o qual, como dito anteriormente, envolve a utilização e sacrifício de grande número de animais até obter sucesso no método (SHIKINA; IHARA; YOSHIKAZI, 2008).

Hong et al. (2004) estudaram o desenvolvimento da linhagem celular espermatogonial do peixe adulto medaka, *Oryzias latipes*, em cultura. Os resultados obtidos mostraram habilidade de gerar células normais e espermatozoides móveis, demonstrando que a capacidade de proliferação contínua em cultura é uma propriedade intrínseca das células-tronco espermatogoniais.

2.6 Material biológico

A padronização desta metodologia foi realizada utilizando-se o curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) (FIGURAS 4B, 4C, 4D e 7), como espécie experimental.

Prochilodus lineatus

A espécie em estudo tem distribuição geográfica ampla no território do Brasil, sendo encontrada do sul ao norte, nas águas de córregos e riachos, águas correntes de rios e ribeirões (ambientes lóticos), bem como em águas paradas dos lagos, lagoas, represas e açudes (ambientes lênticos). *P. lineatus* é classificado taxonomicamente na ordem Characiformes e família Prochilodontidae. No Brasil, é comumente chamado de curimbatá, corimatá, corimba, corimatam e papaterra (GODOY, 1975; SANTOS, 1962). Tais peixes são reofilicos, migram centenas de quilômetros/ano, de rio acima e de rio abaixo, dentro de um ecossistema definido, exigindo determinadas condições endógenas e exógenas para o ato reprodutivo e a alimentação. No Brasil, chamam-se tais espécies de “peixes de piracema”, palavra esta que designa a subida e a desova de tais peixes fluviais (GODOY, 1975).

É um peixe de porte médio e grande, recoberto de escamas grandes, cabeça nua e, relativamente pequena. Apresenta boca protáctil, subterminal, provida de espessos lábios e com numerosos dentes viliformes, conformação apropriada para a escavação e sucção da substância que se nutre. Mostra um colorido cinzento azulado ou esverdeado na região dorso-lateral. Pelo meio das escamas correm linhas claras que dão o colorido prateado; o lado ventral é branco. As nadadeiras dorsais e caudais apresentam linhas escuras e tremidas. As ventrais e as peitorais são escuras e levemente alaranjadas; a anal só tem o bordo posterior colorido (GODOY, 1975; SANTOS, 1962).

P. lineatus vivem nos rios e se alimentam de lodo, preferencialmente algas. Têm hábito de viver com a cabeça voltada para o fundo dos rios e lagos à procura do alimento. Costumam viver em cardumes consideráveis e os machos produzem, por ocasião da desova, um ruído dentro d'água, muito peculiar a essa família de peixes. Saltam com grande facilidade, pulando alto. Durante as piracemas, desovam em lugar de pouca correnteza (GODOY, 1975; SANTOS, 1962).

Santos (1962), ao estudar o curimbatá, verificou que é um peixe que oferece grandes vantagens à piscicultura, pela sua fantástica prolificidade e pela facilidade com que se podem fecundar artificialmente os seus ovócitos.

As larvas de *Prochilodus lineatus* servem como presas para espécies de peixes carnívoros, e peixes adultos são utilizados para o consumo humano, especialmente no Nordeste do Brasil (GONÇALVES et al., 2013; VIVEIROS; TAFFAREL; LEAL, 2014).

FIGURA 4 – EXEMPLARES DE *Prochilodus lineatus*. **A** – Viveiro do CAUNESP onde *Prochilodus lineatus* foram mantidos. **B** – Caixa d'água do Laboratório de Reprodução de Peixes, local onde *P. lineatus* se manteve antes das coletas. **C** – Exemplar de *P. lineatus* sendo anestesiado. **D** – *P. Lineatus* em detalhe, mostrando tamanho utilizado nas coletas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo geral caracterizar tanto as espermatogônias e demais estruturas dos compartimentos tubular e intertubular como a proporção destas estruturas nos testículos, e padronizar métodos de cultivo de espermatogônias primárias presentes nos testículos de curimbatá *Prochilodus lineatus*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Caracterizar morfológicamente os testículos e as espermatogônias.

Avaliar os testículos de curimbatás adultos, enfatizando a presença e a proporção das espermatogônias primárias em relação aos outros subtipos celulares germinativos. Conhecer e caracterizar morfológicamente as espermatogônias primárias por meio de microscopia de luz, por métodos histoquímicos e imunohistoquímicos, e de microscopia eletrônica de transmissão.

3.2.2 Analisar morfométrica e estereológicamente os testículos.

Estimar a variação do diâmetro nuclear das células germinativas durante o processo de espermatogênese.

Avaliar a proporção volumétrica dos testículos ocupada por espermatogônias primárias e demais estruturas dos compartimentos tubular e intertubular, das regiões anterior, média e posterior dos testículos; comparar estatisticamente essas proporções nas distintas regiões.

3.2.3 Determinar a fase e a subfase reprodutiva nos testículos.

Determinar a fase e a subfase no ciclo reprodutivo segundo Brown-Peterson et al. (2011) nos testículos utilizados para as análises morfométrica e estereológica para dar uma classificação reprodutiva aos animais utilizados nestas análises.

3.2.4 Cultivo primário das espermatogônias primárias.

Padronizar métodos para obter e isolar espermatogônias primárias, na tentativa de posteriormente estabelecer protocolos para manter estas células *in vitro* e obter sua diferenciação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.2 Coleta e fixação dos testículos

P. lineatus utilizados para a coleta dos testículos para análise morfológica, morfométrica, estereológica, imunohistoquímica e ultra-estrutural foram peixes machos, adultos, de cativeiro e criados em viveiros do CAUNESP (Centro de Aquicultura da UNESP - Universidade Estadual Paulista, em Jaboticabal) (FIGURA 4A).

Os animais destinados à coleta ficaram em condições abióticas constantes e monitoradas, como temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e amônia, e com fotoperíodo natural. Receberam alimentação à base de ração comercial duas vezes ao dia. A coleta foi aleatória, realizada em maio/2009, sendo que os animais foram sacrificados e os testículos coletados no Laboratório de Reprodução do CAUNESP (FIGURA 4B).

P. lineatus foram anestesiados usando uma dose sub-letal de 0,1 mg/mL de Benzocaína (FIGURA 4C) até a parada total dos movimentos operculares e posteriormente eutanasiados por secção medular. A partir da papila urogenital foi feito um corte ventral no sentido posterior-anterior. Os testículos de 5 animais, após retirados, foram analisadas anatomicamente e os dados biométricos de cada animal foram registrados (comprimento total de $29,3 \pm 0,9$ cm; comprimento padrão de $24,3 \pm 0,5$ cm; peso corporal $337,1 \pm 23,8$ g; valor médio $\pm$ desvio padrão; IGS = 0148 e IHS = 0,771). Fragmentos de três regiões dos testículos (anterior-A, média-M, e posterior-P; sendo a região posterior mais próxima à cauda) foram divididos igualmente, coletados e imediatamente fixados em Bouin (ANEXO I) para o processamento e avaliação do tecido em microscopia de luz e em imunohistoquímica, em Methacarn (ANEXO I) para o processamento e avaliação em imunohistoquímica e em solução de glutaraldeído 4% em tampão fosfato 4% a 0,05M (ANEXO I) para o processamento e avaliação em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T.).

O protocolo experimental está acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL), sendo aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa), sob o número 129, em 22.09.09, com validade de 6 anos.

4.3 Processamento das amostras de testículos para análise morfológica, ultraestrutural e morfométrica

Os fragmentos de testículos foram incluídos segundo métodos de rotina para inclusão em parafina para avaliação em microscopia de luz e imunohistoquímica e em glicol metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Microsystems Nussloch GmbH) para avaliação em microscopia de luz (ANEXO II). Os cortes foram obtidos em micrótomo Leica RM 2155 a 3 μm e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) (ANEXO III), em material incluído em parafina. Cortes foram obtidos em micrótomo Leica RM 2155 a 2 μm e corados com Ácido periódico – Reativo de Schiff (PAS) + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (QUINTERO-HUNTER; GRIER; MUSCATO, 1999), em material incluído em glicol metacrilato, conforme procedimento descrito no ANEXO III.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, outros fragmentos, depois de fixados em glutaraldeído 4%, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% com sacarose, contrastados em bloco com acetato de uranila e incluídos em resina Spurr (Electron Microscopy Sciences). As etapas deste procedimento estão descritas no ANEXO IV. Cortes semifinos (450 nm) e ultrafinos (70 nm) foram realizados em ultra-micrótomo Leica EM VC6. Os cortes finos, coletados em tela de cobre, foram corados com acetato de uranila e nitrato de chumbo. As preparações foram feitas no Laboratório do Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP. Este material foi analisado e fotografado no microscópio eletrônico Jeol 80KW no Centro de Microscopia Eletrônica do ICB1/USP.

4.4 Caracterização morfológica e ultraestrutural dos testículos e das espermatogônias primárias

Os testículos ($n = 5$) coletados em maio/2009 foram analisados anatomicamente e microscopicamente quanto ao arranjo tecidual e quanto às características e proporção das células, enfatizando a presença e a morfologia das espermatogônias primárias. Parâmetros morfológicos, como a quantidade e a localização da cromatina no núcleo, e morfométricos, como o diâmetro celular e nuclear, permitiram que diferentes populações de células germinativas, entre elas as mais indiferenciadas, e o tecido intertubular, fossem identificados em microscopia de luz e em cortes ultrafinos por microscopia eletrônica de transmissão.

Foram estabelecidos os tipos de células comparando as características estruturais e ultraestruturais para os casos já descritos na literatura (BATLOUNI; ROMAGOSA;

BORELLA, 2006; LEAL et al., 2009; LO NOSTRO et al., 2003). Foi utilizado o fotomicroscópio Axioskop 2 (Zeiss, Germany) do Laboratório de Biologia do Endométrio do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP, contendo o Programa AxioVision Rel. 4.7 para as análises microscópicas e captura das imagens.

4.5 Morfometria das células germinativas e de Leydig

Foi obtido o diâmetro celular médio das espermatogônias primárias e secundárias, e o diâmetro nuclear médio das células germinativas e de Leydig dos testículos, em μm . Foi medido o diâmetro do maior lado da célula. Trinta espermatogônias e trinta núcleos de cada tipo celular por animal tiveram os diâmetros medidos, sendo dez espermatogônias e dez núcleos para cada região testicular (anterior, média e posterior). Cinco animais foram utilizados para esta análise. As células germinativas que tiveram o núcleo medido foram: espermatogônia primária (isolada), espermatogônia secundária (células que foram encontradas em grupos de duas células e com características nucleares semelhantes às das espermatogônias primárias), espermatócito primário (pré-leptóteno, leptóteno-zigóteno, paquíteno e diplóteno), espermatócito secundário, espermatíde inicial, espermatíde intermediária, espermatíde final e espermatozoide. Desta forma, os dados obtidos permitiram estimar, dentre outros parâmetros, a evolução dos volumes nuclear das células germinativas e celular das espermatogônias primárias e secundárias no processo espermatogênico de *P. lineatus*, assim como caracterizar o núcleo das células de Leydig.

4.6 Análise estereológica dos componentes testiculares

Foi determinado o percentual volumétrico de cada um dos componentes testiculares (intertubular e tubular) e a proporção de tecido ocupada pelas espermatogônias primárias, após a análise morfológica anterior. Foi realizada a digitalização de 5 campos de cada corte histológico (abrangendo todas as regiões do corte) em aumento de 1000 vezes, com intervalo de 200 μm de um corte ao outro para que não houvesse contagem repetida das mesmas estruturas testiculares. Foram utilizados cinco animais, avaliando-se as regiões anterior, média e posterior dos testículos, separadamente, para comparar a proporção de componentes testiculares entre estas regiões. De cada região testicular foram contados 30 campos histológicos.

Para efeito de contagem, os pontos no compartimento intertubular foram definidos como: células de Leydig, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. Para o compartimento tubular, foram determinados os pontos sobre: os diferentes tipos de cistos germinativos (espermátogônias primárias, espermátogônias secundárias, espermátócitos primários, espermátócitos secundários, espermátides e espermatozoides), células de Sertoli, luz tubular, e túnica própria (camada do compartimento intertubular que circunda o compartimento tubular, composto de células mióides peritubulares, fibras colágenas, e a membrana basal do epitélio germinativo). Os artefatos foram raramente vistos e não foram considerados no número total de pontos usados para obter as porcentagens. Foi utilizado o software de domínio público ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) contendo um retículo com 432 interseções (pontos) inserido sobre cada imagem (FIGURA 5), e foram contadas todas as estruturas sob cada ponto. Foram contados 12.960 pontos de cada região testicular (modificado de ALVARENGA; FRANÇA, 2009; MATTA et al., 2002). As imagens foram obtidas em fotomicroscópio Axioskop 2 (Zeiss, Germany) contendo o Programa AxioVision Rel. 4.7, do Laboratório de Biologia do Endométrio do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP/SP.

FIGURA 5 – EXEMPLO DO RETÍCULO UTILIZADO SOBRE AS IMAGENS NA ESTEREOLOGIA DOS COMPONENTES TESTICULARES DE *Prochilodus lineatus*. O retículo apresentou 432 pontos de intersecção. Material incluído em glicol metacrilato e corado em PAS + Hematoxilina Férrica + *Metanil Yellow*. Barra = 20 μ m. Corte transversal dos testículos.

4.7 Análise estereológica e morfométrica das espermatogônias primárias

Posteriormente, o volume individual médio das espermatogônias primárias foi obtido em micrômetros cúbicos do volume nuclear e da proporção (porcentagem) entre núcleo e citoplasma deste tipo celular. Protocolos anteriormente descritos (LEAL et al., 2009; MATTA et al., 2002; VILELA et al., 2003) foram adaptados de acordo com os nossos objetivos. O volume nuclear desta célula foi estimado usando o diâmetro nuclear médio obtido no item 4.5. Os núcleos medidos foram aqueles que apresentaram o contorno mais arredondado possível e nucléolos bastante evidentes. Para aferir a proporção entre núcleo e citoplasma, foi empregado o Software ImageJ contendo um retículo com 432 interseções (pontos) inserido sobre cada imagem capturada, em aumento de 1000 vezes (FIGURA 6). Cem pontos sobre o citoplasma e o núcleo das espermatogônias primárias isoladas foram contados por animal ($n = 5$). A partir dos dados acima obtidos e aplicando-se as fórmulas abaixo, foram calculados o volume nuclear, o volume do citoplasma e, conseqüentemente, o volume espermatogonial médio. Estes valores serviram de parâmetro para caracterizar as espermatogônias primárias e foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3).

Volume nuclear = $4/3\pi R^3$, onde R = diâmetro nuclear/2

Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear / % núcleo

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático.

De posse do volume (em micrômetros cúbicos) das espermatogônias primárias, da proporção volumétrica (%) das mesmas nos testículos e do volume total (mL) ocupado por estas células nos testículos, foi calculado o número de espermatogônias primárias por testículos de *P. lineatus*.

FIGURA 6 – EXEMPLO DO RETÍCULO UTILIZADO SOBRE AS IMAGENS NA ESTEREOLOGIA E MORFOMETRIA DA ESPERMATOGÔNIA PRIMÁRIA DE *Prochilodus lineatus*. O retículo apresentou 432 pontos de intersecção. Espermatogônia primária em evidência. Material incluído em glicol metacrilato e corado em PAS + Hematoxilina Férrica + *Metanil Yellow*. Barra = 20 μ m. Corte transversal do testículo.

4.8 Análise estatística

Os valores médios $\pm$ DP (desvio padrão) foram calculados para os diâmetros celulares das espermatogônias primárias e secundárias, diâmetros nucleares das células germinativas, percentagem volumétrica de cada componente dos compartimentos tubular e intertubular de cada região testicular. O diâmetro nuclear médio em todas as células germinativas foi comparado por análise de variância (ANOVA), seguida por teste t (*Student*). Os valores médios obtidos para as percentagens volumétricas foram transformados em arco seno da raiz quadrada da taxa de componentes dos compartimentos tubular e intertubular; e a homogeneidade das variâncias foi verificada. Os valores médios foram analisados por ANOVA para comparar as porcentagens volumétricas entre as três regiões dos testículos. O nível de significância de 5% foi considerado para todos os testes.

4.9 Avaliação da fase e da subfase reprodutiva nos testículos utilizados nas análises morfométrica e estereológica

A fase e a subfase no ciclo reprodutivo foram avaliadas e determinadas nos testículos utilizados nas análises morfométrica e estereológica ($n = 5$). As avaliações seguiram a terminologia padronizada e proposta por Brown-Peterson et al. (2011), a qual utiliza de critérios morfológicos e histológicos para distinguir as fases e as subfases reprodutivas em peixes teleósteos machos. Fragmentos de testículos utilizados foram fixados por imersão em líquido de Bouin, incluídos em parafina, e os cortes foram obtidos a 3 μm e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Foram utilizados também para esta análise, fragmentos de testículos do mesmo animal fixados por imersão em glutaraldeído 4% a 0,05M, incluídos em glicol metacrilato, cortados a 2 μm e corados com Ácido periódico – Reativo de Schiff (PAS) + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow. As três regiões dos testículos (A, M e P) foram analisadas em cada animal. Foi utilizado o fotomicroscópio Axioskop 2 (Zeiss, Germany), do Laboratório de Endocrinologia de Peixes e do Laboratório de Biologia do Endométrio do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP/SP para as avaliações e obtenção das imagens.

4.10 Imunoperoxidase com anti-OCT4, anti-GFR α 1 e anti-Vasa aplicada aos testículos

Os testículos selecionados para o método imunohistoquímico foram fixados em líquido de Bouin e em Methacarn (PURCHTLER et al., 1970) (ANEXO I) e foram processados por meio de técnicas de rotina para microscopia de luz e incluídos em parafina. Os cortes foram obtidos em micrótomo comum a 3 μm . Foi realizada a recuperação antigênica com tampão Citrato de Sódio 0,01M (pH 6,0). Após este passo, todas as etapas de lavagens dos cortes foram realizadas com TBS+Triton X-100 a 0,025%. O bloqueio da biotina endógena foi realizado com solução de Avidina/Biotina (*Avidin/Biotin Blockin Kit*, Vecto Laboratories, Inc, SP-2001) e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H_2O_2 3% em TBS. Realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos dos anticorpos com soro de cabra 10% + 1% de BSA em TBS e, posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em TBS + 1% de BSA. Utilizaram-se os anticorpos primários anti-OCT4 (Abcam, ab18976, Rabbit anti-human) (1:5) que é um marcador de células tronco pluripotentes e germinativas primordiais, anti-GFR α 1 (Abcam, ab84106, Rabbit anti-human) (1:500) que é um marcador que pode ser usado para caracterizar e selecionar as células tronco espermatogoniais, e anti-Vasa (Abcam, ab13840, Rabbit anti-human) (1:200) que é um

marcador de células germinativas. Os cortes foram incubados com os anticorpos secundários diluídos em TBS + 1% de BSA. Utilizou-se o anticorpo secundário anti-Rabbit IgG Biotinilado (Vector, Laboratories, BA-1000) contra os anticorpos primários. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e revelados com 3-3' diaminobenzidina (DAB). Como controle negativo, foram omitidos os anticorpos primários. Todos os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Mayer.

4.11 Obtenção e isolamento das espermatogônias primárias

As células germinativas foram obtidas por meio de digestão enzimática (colagenase, tripsina e DNase) dos testículos de *P. lineatus*. Desta forma, protocolos anteriormente descritos (BELLVÉ et al., 1977; LACERDA et al., 2006; LACERDA et al., 2008; LACERDA et al., 2010; LACERDA et al., 2013) foram adaptados de acordo com os nossos objetivos.

4.11.1 Aclimação laboratorial dos exemplares de Prochilodus lineatus

Os exemplares de *P. lineatus* utilizados nos experimentos de obtenção das células germinativas foram doados pelo Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) e pela Companhia Energética de São Paulo (CESP, Usina Hidrelétrica de Paraibuna-SP).

Os animais foram aclimatados ao laboratório por um período de no mínimo sete dias, em aquários de 200 L, contendo água da rede de distribuição previamente purificada e oxigenada. A água dos aquários foi oxigenada continuamente com a ajuda de compressores de ar e filtros externo Hopar Canister HF 3323 com vazão 2.200 litros por hora com filtragem química, mecânica e biológica. Juntamente a este filtro foi utilizado um sistema de esterilização por lâmpada ultravioleta (*UV-611 Sterilization Lamp*) permitindo a destruição de bactérias na água e a decomposição de orgânicos. Os valores médios de temperatura da água foram ajustados por aquecedores acoplados ao termostato.

Os animais permaneceram em condições abióticas constantes, verificadas a cada 48 horas, sendo que os valores de temperatura foi de 26,9 °C ($\pm 2,6$), o pH de 6,5 ($\pm 0,3$) e o oxigênio dissolvido de 4,9 mg/L ($\pm 0,8$).

Após o período de 7 dias, os valores médios de temperatura da água foram diminuídos 2 °C / dia até atingir 20 °C. Esta temperatura foi mantida por um período de no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos, com o objetivo de aumentar a autorrenovação

espermatogonial e induzir a apoptose de células germinativas mais avançadas nos testículos (ALVARENGA; FRANÇA, 2009) para a obtenção das células germinativas, em especial das espermatogônias primárias. Os aquários tiveram suas faces laterais e posterior revestidas com plástico adesivo verde (FIGURA 7), proporcionando melhor adaptação dos peixes ao ambiente de laboratório (FANTA, 1995).

O fotoperíodo foi de 12 horas luz/12 horas escuro, controlado por timer. Os animais foram alimentados uma vez a cada dois dias com ração comercial, a qual foi suspensa 24 horas antes do início dos experimentos a fim de evitar restos de alimento no intestino, uma vez que durante a coleta este poderia ser perfurado e contaminar os testículos.

FIGURA 7 – Aclimação dos exemplares de *Prochilodus lineatus* antes de serem utilizados nos procedimentos para obtenção das espermatogônias primárias.

4.11.2 Digestão enzimática dos testículos

Após o período de aclimação, os exemplares foram anestesiados (FIGURA 8A) usando-se uma dose sub-letal de 0,1 mg/mL de benzocaína. Dados biométricos dos animais foram registrados. Os animais apresentaram valores médios de peso total do corpo de 2,14 Kg ($\pm 0,51$), comprimento total de 47 cm ($\pm 2,24$), comprimento padrão de 39,5 cm ($\pm 1,95$) e peso dos testículos de 3,67 g ($\pm 1,81$) (médias $\pm$ desvio padrão da média). Em seguida, os exemplares foram aspergidos com álcool a 70% (FIGURA 8B), com a finalidade de facilitar a realização dos procedimentos necessários em condição asséptica e à temperatura ambiente. Em seguida amostras de sangue foram coletadas para a aquisição do soro de *P. lineatus* (ANEXO VI), utilizado como suplemento no cultivo celular. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por secção medular. A partir da papila urogenital, foi feito um corte

ventral no sentido póstero-anterior (FIGURA 8C) para a retirada dos testículos (FIGURA 8D). Estes foram coletados cuidadosamente, lavados em solução de PBS 0,1 M + Antibióticos (AB, penicilina/estreptomicina – 10.000U/10 mg/mL, AMRESCO) + Anfotericina (Anf – 1 mg/mL, Vitrocell Embriolife) + Gentamicina (Gent – 50 mg/mL, Vitrocell Embriolife) (ANEXO V), pesados, colocados em vidro tipo becker estéril (FIGURA 7A) contendo solução de hipoclorito 0,5% por dois minutos (PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011) e posteriormente, em PBS + AB + Anf + Gent. Dentro da capela de fluxo laminar, os testículos foram transferidos para uma placa de Petri contendo solução salina balanceada de Hanks – HBSS (Sigma - Aldrich Inc., Saint Louis MO, USA) + AB + Anf + Gent (ANEXO V), cortados em pequenos fragmentos ($\sim 1,5 \text{ mm}^3$) (FIGURA 9B) e lavados por várias vezes (até cinco vezes) (FIGURA 9C) em HBSS a fim de retirar o excesso de sêmen e sangue.

A seguir, preparou-se uma solução de collagenase (Tipo IA, Sigma – Aldrich Inc., Saint Louis MO, USA) em meio de cultura D-MEM/F-12 (Dubelco's Modified Eagle Médium, Sigma) na concentração de 2 mg/mL, esterilizada em filtro 0,22 μm (Millipore) contendo AB + Anf + Gent (ANEXO V). Aproximadamente um grama dos fragmentos de testículos foram imersos nesta concentração de collagenase em garrafa de cultura estéril de 25 cm^2 e incubados em Shaker (FIGURA 10) sob agitação (190 RPM) durante 1 hora a 25 °C. A seguir, foi adicionado 1% de DNase I (Sigma - Aldrich Inc., Saint Louis MO, USA) para diminuir a viscosidade do meio e facilitar a dispersão das células que foram incubadas por mais 3 horas sob a mesma agitação.

FIGURA 8 – COLETA DOS TESTÍCULOS DE *Prochilodus lineatus* PARA OBTENÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS. **A** – Exemplar anestesiado. **B** – Banho de álcool a 70% antes da retirada dos testículos. **C** – Abertura ventral para retirada dos testículos. **D** – Testículos de *P. lineatus* (setas).

FIGURA 9 – PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO PARA OBTENÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE *Prochilodus lineatus*. **A** – Testículos separados em solução de PBS + AB + Anf + Gent. **B** – Testículos recém-coletados e fragmentados em HBSS (Hanks) + AB + Anf + Gent. **C** – Etapas das lavagens dos fragmentos de testículos por várias vezes (até cinco vezes) em HBSS.

FIGURA 10 – PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO PARA OBTENÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE *Prochilodus lineatus*. Incubação dos fragmentos de testículos em Shaker.

Após esse período, alguns pequenos fragmentos testiculares que ainda eram observados após a incubação foram separados da suspensão celular e ressuspendidos em solução de Tripsina a 0,25% (marca própria do Instituto Adolfo Lutz - Núcleo de Cultura de Células) e 1% de DNase I e dissociados mecanicamente com auxílio de uma pipeta (~1mm de diâmetro). Após 20 minutos sob leve agitação, a ação da tripsina foi interrompida pela

adição de 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SBF) (Vitrocell Embriolife). Juntaram-se as suspensões celulares separadas e as submetidas à tripsina e 1% de DNase I (Sigma - Aldrich Inc., Saint Louis MO, USA) foi novamente adicionado, facilitando assim o processo de filtração, que foi realizado em peneira de nylon (BD Falcon) com poros de 70 μ m e 40 μ m, respectivamente, em tubo cônico (tipo *Falcon* 50 mL). O filtrado assim obtido foi centrifugado por 10 minutos (100 g/RCF) a 25 °C (FIGURA 11B). Após a retirada cuidadosa do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 400 μ L de D-MEM/F-12 suplementado com 0,75% (p/v) de BSA (Bovine Serum Albumin, AMRESCO), transferidas para um tubo cônico (tipo Falcon 15 mL) e centrifugadas novamente por 10 minutos (100 g/RCF) a 25 °C (FIGURA 11C). O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e as células foram ressuspensas em 100 μ L de D-MEM/F-12 – BSA 0,75%.

FIGURA 11 – OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO E *PELLET* CELULAR DOS TESTÍCULOS DE *P. lineatus*. **A** – Garrafa de cultura contendo suspensão dos fragmentos dos testículos digeridos após 4h de incubação com collagenase (2mg/ml). **B** – *Pellet* celular obtido na primeira centrifugação após digestão dos testículos com collagenase. **C** – *Pellet* celular obtido na segunda centrifugação após digestão dos testículos com collagenase.

4.11.3 Separação e seleção das células germinativas

As células obtidas a partir da dissociação e digestão enzimática dos testículos foram fracionadas por gradiente descontínuo de densidade com Percoll (Cultilab) a fim de se obter maior concentração de espermatogônias primárias na suspensão a ser cultivada *in vitro*.

Seguindo as normas do fabricante, antes de ser utilizado, a osmolaridade do Percoll foi ajustada, adicionando-se uma parte do diluente presente no kit comercial para cada nove (1:9) de Percoll, solução esta denominada de Percoll 100% (ANEXO I). A partir desta solução e utilizando-se DMEM/F-12 – BSA 0,75%, foram preparadas quatro diferentes concentrações para preparação do gradiente a ser utilizado, Percoll 10%, 20%, 30% e 40% (ANEXO I). Estas soluções em diferentes concentrações foram cuidadosamente e sequencialmente (de 40% para 10%) colocadas em um tubo cônico (tipo Falcon 15 mL) usando-se pipeta (ponteira de 1 mL), com o tubo inclinado e a ponta da pipeta na parede do tubo (FIGURAS 12A e 12B). Finalmente, a suspensão de células foi depositada no topo da coluna contendo Percoll 10% (FIGURA 12C) e centrifugada por 30 minutos (800 g) a 25 °C. Devido à diferença de densidade, com este procedimento, as células concentram-se nas diferentes interfaces das soluções de Percoll, formando bandas visíveis, nas quais as células alvo de nosso interesse (espermatogônias primárias) puderam ser visualizadas e selecionadas, segundo protocolo de Lacerda et al. (2008).

FIGURA 12 – PREPARAÇÃO DO GRADIENTE DE PERCOLL. **A** – Tubo inclinado e a ponta da pipeta na parede do tubo. **B** – Gradiente descontínuo de Percoll utilizado com as concentrações de 10%, 20%, 30% e 40%. **C** – Suspensão de células (1mL/tubo) depositada no topo da coluna contendo Percoll 10% (seta vermelha).

Tendo como objetivo avaliar histologicamente a eficiência da metodologia da separação celular, de acordo com a utilização das diferentes concentrações de Percoll acima citadas, foram utilizadas células provenientes da digestão dos testículos de quatro curimbatás

adultos (aproximadamente 1,5 g de testículos). Assim, após a centrifugação, as bandas celulares formadas foram coletadas isoladamente, colocadas em tubos *Falcon* de 15 mL, lavadas em DMEM/F-12 – BSA 0,75%, centrifugadas e o *pellet* formado fixado em glutaraldeído a 2,5%, a 4 °C. Após 20 horas de fixação, as células foram centrifugadas (14.000 g/RCF) por 15 minutos, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% com sacarose, contrastados em bloco com uranila e incluídos com a técnica de inclusão em resina Spurr (Electron Microscopy Science) (ANEXO I). As etapas deste procedimento estão descritas no ANEXO IV. Cortes semifinos (450 nm) e corados com azul de toluidina foram confeccionados para a análise morfológica das células e escolha dos campos para os cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos (70 nm) foram realizados em ultra-micrótomo Leica EM VC6. Estes foram coletados em tela de cobre, corados com acetato de uranila e nitrato de chumbo. As preparações foram feitas no Laboratório do Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP/SP. Os cortes semi-finos foram analisados e fotografados utilizando-se o fotomicroscópio Axioskop 2 (Zeiss, Germany) do Laboratório de Biologia do Endométrio do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP, contendo o Programa AxioVision Rel. 4.7. Os cortes ultrafinos foram posteriormente, analisados e fotografados no microscópio eletrônico Jeol (80KW) no Centro de Microscopia Eletrônica do ICB1/USP.

Após as análises histológicas dos subtipos celulares contidos em cada banda celular e documentação fotográfica, as duas bandas celulares superiores da coluna de Percoll (10% e 20%) contendo as espermatogônias primárias foram selecionadas para a padronização do método de cultivo celular e separação celular em citômetro de fluxo.

4.12 Plaqueamento diferencial por adesão das células germinativas após centrifugação com Percoll

Após enriquecimento prévio pelo método de centrifugação em gradiente de Percoll, eventuais células somáticas e germinativas mais avançadas ainda estavam presentes no *pool* de células selecionadas das duas camadas superiores da coluna de Percoll. O objetivo da realização do plaqueamento diferencial por adesão foi enriquecer o meio com espermatogônias primárias, eliminando células indesejáveis (células somáticas e germinativas mais avançadas) que, quando presentes em alta concentração durante o cultivo, poderiam dificultar a proliferação, o desenvolvimento e a sobrevivência das espermatogônias primárias.

O protocolo utilizado para seleção de espermatogônias por plaqueamento diferencial por adesão foram adaptações daqueles previamente descritos na literatura para outras espécies de peixes, como, truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008; SHIKINA; YOSHIZAKI, 2010) e tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (LACERDA et al., 2013).

Após verificar a formação de diferentes bandas nas interfaces dos gradientes de Percoll, retirou-se cuidadosamente com pipeta *Pasteur* as duas bandas superiores, por estas apresentarem maior concentração de espermatogônias primárias. Centrifugou-se por 10 minutos a 400 g (RCF) a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SBF + AB, Anf e Gent. Realizou-se o protocolo de contagem e viabilidade celular através do método de exclusão por Azul de Tripán, no Countess™ (Invitrogen). Posteriormente, a suspensão celular foi transferida para uma garrafa estéril de 75 cm² em uma concentração de $2,8 \times 10^7$ /mL e foi acrescentado meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SBF e AB + Anf + Gent para completar o volume para 25 mL. As células foram cultivadas em incubadora com 5% de CO₂ a 25 °C por um período de 14 a 17 horas.

Posteriormente, as células foram analisadas em microscópio de luz invertido. Após este curto período de cultivo, as células somáticas normalmente têm a capacidade de se aderir à placa de cultura, enquanto as células germinativas permanecem suspensas no sobrenadante, ou fracamente aderidas às células somáticas. O sobrenadante contendo as células livres foi coletado, assim como as células frouxamente aderidas às células somáticas. As células que ficaram aderidas foram analisadas e fotografadas. Centrifugou-se a suspensão celular a 100 g por 10 minutos a 25 °C e o *pellet* obtido foi ressuspensionado em 1 mL de meio DMEM-F12. Na sequência, foi feita a contagem das células e analisada a viabilidade das mesmas pelo método de exclusão por Azul de Tripán, no Countess™ (Invitrogen).

4.13 Cultivo primário das espermatogônias primárias

A suspensão celular enriquecida com espermatogônias foi plaqueada em placa de 24 poços cobertas com lamínulas pré-tratadas com gelatina bovina 0,1% (Sigma - Aldrich Inc., Saint Louis MO, USA). As células foram plaqueadas em uma concentração de $7,0 \times 10^5$ células por poço. Múltiplas amostras foram feitas para análise em vários tempos de cultivo após o início da cultura. Dois tipos diferentes de meio de cultura foram preparados e utilizados, separadamente, para analisar o progresso das células em cultivo. O primeiro meio

foi preparado para induzir a proliferação das células *in vitro* (LACERDA et al., 2013; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011; SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008; SHIKINA; YOSHIZAKI, 2010), e o segundo meio foi preparado para induzir a diferenciação celular (HONG et al., 2004; SASAKI et al., 2005). As espermatogônias primárias foram plaqueadas utilizando 1mL do meio de cultura *Dulbecco Modified Eagle médium/Ham F-12 medium* (DMEM/F-12; Sigma Aldrich) contendo glicose 18,2 a 22,2%, tamponado com 15 mM de HEPES e bicarbonato de sódio 1,18 g/L (pH 7,5), suplementado com AB, Anf e Gent, sendo este o meio basal utilizado em ambos os experimentos.

O meio de cultura indicado para a proliferação celular foi suplementado com Glutamina (2 mM), Lactato (0,5 mg/mL), Piruvato de sódio (1 mM), Selenita de sódio (2 nM), Putrescina (6 mg/mL), Apo transferrina bovina (100 µg/mL), Insulina regular humana (0,2 µg/mL), Albumina de Soro Bovino-BSA (0,5%), Solução de aminoácidos não essenciais (1%), 2-mercaptoetanol (100 µM), Fator de crescimento de fibroblasto básico recombinante humano-FGFβ (10 ng/ml; Life Technologies, Invitrogen), Fator de crescimento epidermal recombinante humano-EGF (100 ng/mL; Life Technologies, Invitrogen), *Knockout serum replacement* - formulação livre de soro otimizada para crescer e manter as células-tronco embrionárias não diferenciadas em cultura (1%; Life Technologies, Invitrogen), SBF (10%; Vitrocell Embriolife), Soro de peixe (1%) de *Prochilodus lineatus* adulto (HONG; SCHARTL, 1996; ANEXO VI), Extrato embrionário de peixe de embriões de 7 dias de *Prochilodus lineatus* (EEPI) (extrato de um embrião/mL) (HONG; SCHARTL, 1996; WESTERFIELD, 1995; ANEXO VII). Os suplementos foram comprados da Sigma Aldrich, a não ser que de outra forma indicado. Metade do volume do meio de cultura foi trocado com meio fresco a cada três dias (SAKAI, 2002; SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008), exceto nas amostras em que permaneceram quinze dias sem nenhuma troca de meio (TABELA 1).

O meio de cultura indicado para a diferenciação celular foi suplementado com Glutamina (2 mM), Piruvato de sódio (1 mM), Selenita de sódio (2 nM), Solução de aminoácidos não essenciais (1%), 2-mercaptoetanol (100 µM), Fator de crescimento de fibroblasto básico recombinante humano-FGFβ (10 ng/ml), SBF (15%), Soro de peixe (1%) de curimatá adulto (HONG; SCHARTL, 1996; ANEXO VI).

Outro experimento foi realizado concomitantemente a este, acrescido no meio de cultura o Extrato embrionário de peixe de embriões de 7 dias de *Prochilodus lineatus* (EEPI) (extrato de um embrião/mL) (HONG; SCHARTL, 1996; WESTERFIELD, 1995; ANEXO VII), com o objetivo de se comparar as duas amostras com relação a ocorrência da

diferenciação celular no cultivo. O meio de cultura foi trocado por meio fresco após sete dias de cultivo (modificado de PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011), exceto nas amostras em que permaneceram quinze dias sem nenhuma troca de meio (TABELA 1).

Além disso, em todos os experimentos descritos anteriormente, para observar a proliferação *in vitro* das espermatogônias e, subsequente marcação nos espermatozoides supostamente formados a partir dessas espermatogônias em cultivo, as células foram incubadas no dia 0 com 0,5 μ M de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina, Sigma Aldrich) (SASAKI et al., 2005) no meio de cultura. Após 3, 5, 8, e 15 dias de cultivo, as amostras contendo meio de cultura para proliferação celular e que tiveram o meio de cultura trocado a cada três dias, foram coletadas e fixadas, assim como as amostras em que ficaram 15 dias em cultivo sem nenhuma troca de meio (TABELA 1). Após 8 e 15 dias, as amostras contendo meio para diferenciação celular, com extrato embrionário de *P. lineatus* e sem extrato embrionário de *P. lineatus*, assim como as amostras em que tiveram o meio trocado após sete dias e as amostras em que não tiveram nenhuma troca de meio por 15 dias, tiveram as células coletadas e fixadas (TABELA 1). O fixador utilizado foi o paraformaldeído 4%. As células foram fixadas por 30 minutos a 4 °C para posteriormente, serem processadas para avaliação pelo método de imunofluorescência.

TABELA 1 – Meios de cultura utilizados e resumo das principais etapas realizadas durante a cultivo primário das espermatogônias primárias de *Prochilodus lineatus*.

MEIO PARA PROLIFERAÇÃO	MEIO PARA DIFERENCIAÇÃO
-	Com EEPI e sem EEPI
Troca do meio a cada 3 dias	Troca do meio a cada sete dias
15 dias sem troca do meio	15 dias sem troca do meio
Coletas após 3, 5, 8 e 15 dias de cultivo	Coletas após 8 e 15 dias de cultivo

As culturas foram observadas e fotografadas a cada 24 horas, em fotomicroscópio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL, do Laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP/SP, Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento.

4.14 Método de imunofluorescência das células cultivadas

As células cultivadas em lâminulas pré-tratadas com gelatina bovina 0,1% foram submetidas ao método de imunofluorescência. Após o período de cultivo, as células foram lavadas com PBS, fixadas com Paraformaldeído 4% + sacarose 5% a 4 °C por 30 minutos e lavadas novamente com PBS para retirar o excesso de fixador. Em seguida, as células foram submetidas à recuperação antigênica com solução de Dodecilsulfato de sódio 1% (SDS)/PBS. Realizou-se o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos com PBS 0,01 M/Soro de cabra 10%, bloqueio da autofluorescência com PBS 0,01 M/glicina 1% e permeabilização de membrana com Triton X-100 0,05%/PBS. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-BrdU (Sigma, B8434, Mouse anti-human) (1:200) que é um marcador de proliferação celular, anti-OCT4 (Abcam, ab18976, Rabbit anti-human) (1:100), anti-OCT4 (Millipore, MAB4419, Mouse anti-human) (1:100) que é um marcador de células tronco pluripotentes e germinativas primordiais, anti-GFR α 1 (Abcam, Ab84106, Rabbit anti-human) (1:160) que é um marcador que pode ser usado para caracterizar e selecionar as células tronco espermatogoniais e anti-Vasa (Abcam, ab13840, Rabbit anti-human) (1:250) que é um marcador de células germinativas.

Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos secundários Alexa Fluor 594 (Abcam, Ab150108, Donkey anti-mouse IgG, cor vermelho) (1:500) e Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21206, Donkey anti-Rabbit IgG, cor verde) (1:500) contra os anticorpos primários anti-BrdU e anti-Oct4 (Millipore) e anti-OCT4 (Abcam), anti-GFR α 1 e anti-Vasa, respectivamente. Como controle negativo, foram omitidos os anticorpos primários. As lâminulas foram aderidas em lâminas histológicas com meio de montagem para fluorescência VectaShield contra corado com DAPI. O material foi analisado e fotografado ao fotomicroscópio Nikon Eclipse E600 contendo o Programa Image-ProPlus Versão 6.3.0.512 para a aquisição das imagens do Laboratório de Biologia da Reprodução & Matriz Extracelular do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP/SP.

4.15 Separação das espermatogônias primárias por citometria de fluxo – *Cell sorting*

Os métodos de separação com Percoll seguido do plaqueamento diferencial por adesão realizados, não separaram com alto grau de pureza as espermatogônias primárias, mostrando contaminação do meio com muitas células germinativas mais diferenciadas, como espermatogônias secundárias, espermatócitos, espermátides, espermatozoides e células

somáticas. Com o objetivo de purificar o meio de cultura com espermatogônias primárias, realizou-se a separação das células pelo método do *Cell sorting*, em citometria de fluxo (KISE et al., 2012).

Para esta etapa, foram utilizadas células obtidas da digestão enzimática dos testículos que não foram separadas por Percoll e células oriundas das duas camadas superiores da coluna de Percoll, por estas apresentarem maior concentração de espermatogônias primárias. Esta análise teve como objetivo comparar o rendimento da separação celular entre as duas amostras. Para este procedimento foram utilizadas $30,13 \times 10^6$ células/mL nas amostras sem Percoll e $2,41 \times 10^6$ células/mL nas amostras com Percoll. Antes da separação, as células foram tratadas com 1% de DNase I (Sigma) para diminuir a viscosidade do meio e facilitar o processo de filtragem e filtradas por duas vezes em tubos para citometria de fluxo com peneira de nylon de poros de 35 μ m para remover debrís e grumos celulares.

O citômetro utilizado para a realização da separação celular foi o BD FACS Aria™ III. As diferentes populações celulares presentes foram determinadas de quatro *gates* em um histograma bi-dimensional produzido antes de serem separadas, para cada amostra, sem Percoll e com Percoll. Os critérios do método de separação das espermatogônias primárias utilizados nesta etapa foram baseados somente nas propriedades de tamanho e granularidade celular, e não na presença de um marcador (KISE et al., 2012), visto que estas células são as maiores células germinativas dos testículos e apresentam citoplasma esparso, ou seja, com baixo grau de granularidade, e as células somáticas apresentam muitos grânulos citoplasmáticos por serem células fagocíticas. Posteriormente, foi realizada a análise da pureza de cada população obtida na separação no próprio citômetro e a contagem do número de células obtido foi realizado no contador de células automático, Countess™ (Invitrogen™), em cada população. Em seguida, as populações celulares obtidas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% a 4 °C por 24 horas e centrifugadas a 400 g (RCF) por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado ficando apenas 50 μ L deste que foi ressuspensionado com o *pellet* celular. As suspensões celulares foram depositadas em lâminas histológicas tratadas com poli-L-lisina (Sigma) e secas *overnight* em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS (Tampão Fosfato Salino 0,1 M), coradas com Hematoxilina e Eosina, desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas em xilol e montadas com Goma de Damar (modificado de HAYASHI et al., 2014). A morfologia das diferentes populações celulares separadas foram analisadas e fotografadas utilizando o fotomicroscópio

Axioskop 2 (Zeiss, Germany) do Laboratório de Biologia do Endométrio do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP, contendo o Programa AxioVision Rel. 4.7.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica dos testículos

Foi realizada uma coleta de testículos de cinco *P. lineatus* para a caracterização morfológica do tecido. Para esta avaliação, os testículos incluídos em parafina foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) (ANEXO III), e em Ácido periódico – Reativo de Schiff (PAS) + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow, conforme procedimento descrito no ANEXO III, em material incluído em glicol metacrilato. O tecido testicular foi analisado e fotografado em fotomicroscópio Axioskop 2 (Zeiss, Germany) contendo o Programa AxioVision Rel. 4.7, do Laboratório de Biologia do Endométrio do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP.

Os testículos de *P. lineatus* são estruturas pares, alongadas e cilíndricas, de aspecto uniforme, que se estendem dorsal e longitudinalmente pela cavidade da região abdominal (FIGURA 13A), ventralmente ao rim e paralelamente à bexiga natatória, estando conectados à parede abdominal dorsal pelo mesórquio. Apresentam-se livres na porção anterior e média, porém, fundem-se gradativamente na região posterior formando um ducto espermático comum que se abre ao meio externo através da papila urogenital, por onde o semen é eliminado. Constituem-se externamente pela túnica albugínea (FIGURAS 13B e 14A) e, internamente, são formados pelos tecidos intertubular (intersticial) e tubular (germinativo), separados por uma membrana basal (FIGURA 14E).

O tecido intertubular apresenta tecido conjuntivo frouxo com células de Leydig e células mióides peritubulares, assim como inúmeros vasos sanguíneos (FIGURAS 14B, 14C, 14D, 14F e 14G). As células de Leydig (FIGURAS 14C, 14D e 14G) apresentam núcleo esférico ou oval ($4,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$), às vezes com formato irregular, poligonal, com um ou mais nucléolos e cromatina descondensada. Em microscopia de luz, os limites celulares são de difícil visualização (FIGURAS 14C e 14D). Estas células encontram-se isoladas e agrupadas ao longo do tecido intersticial e da região que compreende a túnica albugínea, frequentemente próximas a vasos sanguíneos (FIGURAS 14C, 14D e 14G). As células mióides são células alongadas, com núcleo com cromatina condensada com um ou dois nucléolos (FIGURAS 14B, 14F e 14H). Estão separadas da membrana basal e de outras células intersticiais por fibras colágenas. São encontradas em abundância próximas à membrana basal do epitélio germinativo (região da túnica própria) delineando os túbulos seminíferos, mas são encontradas também dispersas em outras regiões do interstício. As fibras colágenas estão

presente em grande quantidade entre as estruturas do compartimento intertubular (FIGURA 14I).

O tecido germinativo apresenta túbulos seminíferos em corte transversal e longitudinal, sendo esta característica indicadora de estrutura testicular do tipo tubular anastomosado (FIGURA 13B). Estes túbulos anastomosados esvaziam-se dorsalmente para o ducto principal (FIGURA 13B), que se observa nas regiões anterior, média e posterior dos testículos, onde se fusionam formando um único ducto espermático. O ducto principal é revestido por epitélio simples que varia a forma ao longo do ducto, mostrando núcleos prismáticos, cilíndricos e pavimentosos.

Os túbulos seminíferos contêm cistos com células germinativas em distintas fases de maturação e em desenvolvimento sincrônico (FIGURA 14A). Observam-se inúmeras espermatogônias primárias isoladas (FIGURAS 14B, 14C e 14D) e cistos de espermatogônias secundárias (FIGURA 14C), a maioria em divisão mitótica, mostrando que os testículos encontravam-se em processo de crescimento. Cistos de espermatócitos e de espermátides foram encontrados, assim como muitos espermatozoides na luz dos túbulos (FIGURA 14A). Células de Sertoli foram encontradas envolvendo as espermatogônias primárias e os cistos das demais células germinativas (FIGURA 14B, 14C e 14D). O núcleo destas células apresentou formas variadas, desde esféricas e ovais, até triangulares e alongadas. No citoplasma, foi comum encontrar corpos delimitados por membrana, de vários tamanhos e formas, contendo substâncias de diferentes densidades (corpos residuais em forma de fagossomos). As células de Sertoli estavam conectadas umas com as outras através de complexo juncional e de interdigitações.

5.2 Aspectos morfológicos e morfométricos

As espermatogônias primárias são células isoladas (FIGURAS 15A, 15B, 15C, 15D e 16B), envoltas por um número variável de células de Sertoli, sendo as maiores células germinativas nos testículos ($16,382 \pm 0,164 \mu\text{m}$ em diâmetro). Apresentavam citoplasma abundante e claro, com retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, e estruturas eletrondensas, as “nuages”, encontradas geralmente próximas ao envoltório nuclear e associadas às mitocôndrias (FIGURAS 15C e 15D). O núcleo proeminente ($9,22 \pm 0,31 \mu\text{m}$ em diâmetro) era levemente oval ou esférico e excêntrico com um nucléolo evidente e cromatina descondensada, possuindo assim, características nucleares distintas das espermatogônias secundárias.

As espermatogônias primárias dão origem às espermatogônias secundárias (FIGURAS 15B e 15E). As espermatogônias secundárias foram caracterizadas pela diminuição no tamanho celular ($13,118 \pm 0,214 \mu\text{m}$ em diâmetro) e nuclear ($7,434 \pm 0,025 \mu\text{m}$ em diâmetro). Estas células foram encontradas em número variável no interior de cistos envoltos por células de Sertoli. Apresentaram citoplasma escasso com “nuages” dispostas ao redor do núcleo e associadas às mitocôndrias (FIGURA 15E). O núcleo central, geralmente esférico ou um pouco alongado, apresentou 1 ou 2 nucléolos e aumento na densidade, mostrando que a heterocromatina começa a aparecer como manchas ao longo do envelope nuclear. As espermatogônias secundárias sofrem sucessivas divisões mitóticas antes de originar os espermatócitos primários e ficam conectadas por pontes citoplasmáticas devido à citocinese incompleta.

Os espermatócitos foram identificados nas diferentes fases da meiose pelas características nucleares, tais como o tamanho, condensação cromossômica, e figuras meióticas dos cromossomos (por exemplo, metáfase I ou II; FIGURA 16, A-H). O citoplasma mostrou-se hialino, tornando-se difícil a identificação dos limites celulares. Os espermatócitos pré-leptotênicos (FIGURA 16A) tiveram o núcleo de menor tamanho comparado aos demais tipos de espermatócitos primários ($4,525 \pm 0,090 \mu\text{m}$ em diâmetro), com vários nucléolos pequenos e manchas de heterocromatina na periferia e ao longo do envelope nuclear. Os espermatócitos leptotênicos/zigóteno (FIGURA 16B), foram assim identificados por terem características nucleares semelhantes em microscopia de luz, como densidade da cromatina e tamanho. Foram os maiores tipos de células entre os espermatócitos, mostrando núcleo ($6,213 \pm 0,066 \mu\text{m}$ em diâmetro) com cromatina mais descondensada e mais homogênea comparado com os espermatócitos pré-leptotênicos, sendo observadas poucas manchas de heterocromatina na periferia do envelope nuclear. O aparecimento de complexos sinaptonêmicos foi observado no interior do núcleo (FIGURA 16C). Os espermatócitos em paquíteno apresentaram o núcleo com cromatina mais condensada e continham cromossomas como linhas da periferia para a parte central do núcleo (FIGURA 16B). Ultraestruturalmente, a heterocromatina aparecia como manchas escuras (FIGURA 16D). Devido à condensação cromossômica o núcleo diminuiu em tamanho ($5,707 \pm 0,174 \mu\text{m}$ em diâmetro). Os espermatócitos em diplóteno foram sempre encontrados juntos com figuras metafásicas (metáfase I; FIGURA 16E). Comparado aos demais tipos de espermatócitos primários, neste tipo de célula, os cromossomas atingem o grau máximo de condensação (FIGURA 16F), reduzindo ainda o diâmetro nuclear ($5,257 \pm 0,117 \mu\text{m}$ em diâmetro). Os espermatócitos

secundários dificilmente foram observados, por eles entrarem rapidamente em meiose II, mas foram facilmente encontrados junto com figuras metafásicas (metáfase II; FIGURAS 16G e 16H). Eles têm um núcleo esférico com uma cromatina condensada que cora fortemente com hematoxilina férrica. Comparado com os espermátócitos primários foi observado uma diminuição no tamanho celular e nuclear ($4,027 \pm 0,067 \mu\text{m}$ em diâmetro). O citoplasma deles é reduzido e pobremente visível.

A espermiogênese em *P. lineatus* é marcada por uma redução notável no tamanho celular, nuclear e condensação da cromatina. Três tipos de espermátides diferenciadas foram observadas em *P. lineatus*: espermátides iniciais, intermediárias e finais. As espermátides iniciais com núcleo esférico ($3,199 \pm 0,087 \mu\text{m}$ em diâmetro-FIGURA 17, A-B) e cromatina levemente filamentosa foram observadas próximas umas das outras. Neste estágio inicia-se a formação da fossa nuclear e do flagelo. O citoplasma é reduzido, e um número variável de mitocôndrias foi observada na região próxima à fossa nuclear. Dentro da fossa nuclear, foi observado um par de centríolos, o proximal e o distal. A partir do centríolo distal, teve início a formação do flagelo (FIGURA 17B). As espermátides intermediárias apresentaram o maior eixo nuclear de $2,440 \pm 0,050 \mu\text{m}$ em diâmetro-FIGURAS 17A e 17C), aumento na densidade nuclear e cromatina levemente filamentosa. As espermátides finais com núcleo de $2,049 \pm 0,030 \mu\text{m}$ em diâmetro-FIGURA 17, D-G). O aspecto filamentoso da cromatina nuclear ficou mais evidente mostrando áreas elétron-lúcidas e o flagelo foi observado mais desenvolvido. As mitocôndrias, em número variável, foram encontradas na região da peça intermediária. Esta classificação baseou-se na compactação nuclear, aumento do espaço entre as espermátides e formação do flagelo. A transformação de espermátides à espermatozoides maduros envolve uma perda no conteúdo celular como “corpos residuais”, uma redução nuclear ($1,858 \pm 0,054 \mu\text{m}$ em diâmetro), o desenvolvimento de um flagelo e a liberação destas células do espermatocisto para a luz tubular. Os espermatozoides são as células germinativas que apresentam o maior grau de compactação da cromatina nos testículos de *P. lineatus* (FIGURAS 17G, 17H e 17I), núcleo arredondado mostrando cromatina formada por filamentos espessos com áreas elétron-lúcidas. O citoplasma apresentou um número variável de mitocôndrias na região da peça intermediária. Foi observada a ausência de acrossoomo (FIGURAS 17H e 17I). O flagelo do espermatozoide tem a estrutura típica de axonema 9+2.

FIGURA 13 – ORGANIZAÇÃO ANATÔMICA E MORFOLÓGICA DOS TESTÍCULOS DE *Prochilodus lineatus*. **A** – Testículos (T) presos à parede da cavidade abdominal pelo mesórquio. **B** – Túnica albugínea (TA), ducto principal localizado dorsalmente e preenchido com espermatozoides. Os túbulos seminíferos frequentemente mostraram um padrão anastomosado (seta). Corte transversal do testículo. Material incluído em glicol metacrilato e corado em PAS + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow. Barra = 300 nm.

FIGURA 14 – ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS TESTÍCULOS DE *Prochilodus lineatus*. **A** – Túnica albugínea (cabeça de seta). Túbulos seminíferos mostrando cistos com células germinativas em diferentes estágios de maturação (seta cheia): espermatócitos primários (oc), espermatídes (st) e espermatozoides (sp) no lúmen. **B** – Observar espermatogônias primárias (estrela), espermatogônias secundárias (cabeça de seta), células de Sertoli (seta) e células mióides peritubulares (Mi). **C** e **D** – Espermatogônias primárias (G1), espermatogônias secundárias (G2), células de Sertoli (S e seta preta) e grupo de células de Leydig (Ly) no compartimento intertubular (ci) próximas a um vaso sanguíneo (V). **E** – Membrana basal (mb) separando o compartimento tubular (ct) do intertubular (ci) e lúmen tubular. **F** – Compartimento tubular (ct) do testículo mostrando túnica própria (Tp) envolvendo os túbulos seminíferos e células mióides peritubulares (Mi). **G** – Grupo de células de Leydig (Ly) próximas a um vaso sanguíneo com hemácias (He). **H** – Célula mióide peritubular (Mi). **I** – Fibras colágenas (fc) presentes no compartimento intertubular (ci). **A-F** – Corte transversal do testículo. **A** e **B** – Material incluído em parafina e corado com HE. Barra em **A** = 100 µm e em **B** = 10 µm. **C** – Corte semifino do testículo corado com Azul de toluidina. **D-F** – Material incluído em glicol metacrilato e corado em PAS + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow. Barras = 10 µm. **G-I** – Microscopia eletrônica de transmissão.

FIGURA 15 – ESPERMATOGÔNIAS DE *Prochilodus lineatus*. Compartimento intertubular (ci), compartimento tubular (ct). **A** e **Inset** e **B** – Espermatogônia primária (seta preta) e espermatogônias secundárias dentro do cisto (G2). **C** e **D** – Espermatogônia primária em evidência. **E** – Espermatogônias secundárias em evidência dentro do cisto. N, núcleo; Nu, nucléolo; Ne, Nuages; mi, mitocôndrias. **A** e **B** – Material incluído em glicol metacrilato e corado em PAS + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow. Barra = 20 µm. Corte transversal do testículo. **C-E** – Microscopia eletrônica de transmissão.

FIGURA 16 – DIFERENTES ESTÁGIOS DE ESPERMATÓCITOS OBSERVADOS DURANTE O PROCESSO MEIÓTICO EM *Prochilodus lineatus*. A – Cisto de espermatócitos primários em pré-leptóteno (PL). B – Cisto de espermatócitos primários em leptóteno-zigóteno (L/Z) e em paquíteno (P). C –

Espermatócito primário em leptóteno-zigóteno. **D** – Espermatócito primário em paquíteno. **E** – Cisto de espermatócitos primários em diplóteno (**D**). **F** – Espermatócito primário em diplóteno. **G** – Cisto de espermatócitos secundários (**SS**). **H** – Espermatócitos secundários. Compartimento intertubular (**ci**); compartimento tubular (**ct**); espermatogônia primária (**seta preta**); figuras metafásicas (**seta azul**); vaso sanguíneo (**vs**); núcleo (**N**); metáfase (**M**); complexo sinaptonêmico (**CS**). **A, B, E e G** – Material incluído em glicol metacrilato e corado em PAS + Hematoxilina Férrica + *Metanil Yellow*. Barra = 20 μm . Barra *Inset* A, B e E = 10 μm . Corte transversal do testículo. **C, D, F e H** – Microscopia eletrônica de transmissão.

FIGURA 17 – ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE ESPERMÁTIDES A ESPERMATOZOIDES DURANTE A ESPERMIOGÊNESE EM *Prochilodus lineatus*. **A** – Espermátides inicial (e1) e espermátides intermediária (e2). **B** – Espermátide inicial. Complexo centriolar com centríolos proximal e distal inseridos em uma fossa nuclear pequena. **C** – Espermátide intermediária. Observar aumento na densidade nuclear. **D-F** – Espermátides final no cisto (e3). Observar cromatina filamentososa. **G** – Espermátides final (e3) e espermatozoide no lúmen tubular (sz). **H** – Observar flagelo (fl) do espermatozoide e complexo sinaptonêmico (cs) de um espermatócito primário em leptóteno/zigóteno. **I** – Espermatozoide com cabeça redonda no lúmen tubular. Observar cromatina nuclear formada por filamentos grossos com área elétron-lúcida, número de mitocôndria variável na região da peça intermediária e flagelo (fl). G2, espermatogônias secundária; Ly, células de Leydig; metáfase de espermatócito primário em diplóteno (seta azul); N, núcleo; cd, centríolo distal; cp, centríolo proximal; Fn, fossa nuclear; mi, mitocôndria. **A, D e G** – Material incluído em glicol metacrilato e corado em PAS + Hematoxilina Férrica + *Metanil Yellow*. Barra = 20 μm . **B, C, E, F, H e I** – Microscopia eletrônica de transmissão.

5.2 Análise estereológica dos componentes testiculares

Considerando-se um nível de significância de 5%, não foi detectada diferença significativa no percentual volumétrico dos compartimentos tubular e intertubular e de cada um dos componentes destes compartimentos entre as regiões anterior, média e posterior dos testículos de *Prochilodus lineatus* (n = 5) (FIGURA 18). Os percentuais volumétricos obtidos foram: compartimento tubular: p=0,529; espermatogônias primárias: p=0,678; espermatogônias secundárias: p=0,274; espermátócitos primários: p=0,481; espermátócitos secundários: p= 0,788; espermátides: p=0,939; espermatozoides: p=0,079; células de Sertoli: p=0,158; luz tubular: p=0,183; túnica própria: p=0,154; células de Leydig: p=0,803; vasos sanguíneos: p=0,106; tecido conjuntivo: p=0,587.

O percentual volumétrico médio ($\pm$ erro padrão da média) dos compartimentos tubular e intertubular e de cada um dos componentes destes compartimentos podem ser observados nas TABELAS 2 e 3, respectivamente. Os artefatos foram raramente encontrados e não foram incluídos nos dados.

FIGURA 18 – PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA DOS COMPONENTES DOS COMPARTIMENTOS TUBULAR E INTERTUBULAR NAS REGIÕES ANTERIOR, MÉDIA E POSTERIOR NOS TESTÍCULOS DE *P. lineatus* (n = 5). Abreviações: SG1, espermatogônias primárias; SG2, espermatogônias secundárias; OS, espermátócitos primários; SS, espermátócitos secundários; ST, espermátides; SPZ, espermatozoides; S, células de Sertoli; LT, lúmen tubular; TP, túnica própria; L, células de Leydig; V, vasos sanguíneos; TC, tecido conjuntivo.

TABELA 2 – Percentual volumétrico médio ($\pm$ erro padrão da média) do compartimento tubular e dos componentes do compartimento tubular das regiões anterior, média e posterior dos testículos de *P. lineatus*.

	Anterior (%)	Média (%)	Posterior (%)
Compartimento tubular	89,952 ($\pm$ 3,048)	90,368 ($\pm$ 1,336)	87,141 ($\pm$ 2,024)
Espermatogônias primárias	0,561 ($\pm$ 0,133)	0,591 ($\pm$ 0,102)	0,677 ($\pm$ 0,091)
Espermatogônias secundárias	16,007 ($\pm$ 1,935)	16,825 ($\pm$ 1,463)	12,887 ($\pm$ 1,860)
Espermatócitos primários	25,508 ($\pm$ 2,653)	29,179 ($\pm$ 0,976)	28,845 ($\pm$ 2,921)
Espermatócitos secundários	1,154 ($\pm$ 0,329)	0,872 ($\pm$ 0,108)	0,916 ($\pm$ 0,176)
Espermátides	22,690 ($\pm$ 2,648)	21,581 ($\pm$ 1,546)	22,485 ($\pm$ 1,872)
Espermatozoides	4,420 ($\pm$ 0,668)	2,509 ($\pm$ 0,439)	4,074 ($\pm$ 0,652)
Células de Sertoli	10,773 ($\pm$ 0,886)	11,996 ($\pm$ 0,756)	9,480 ($\pm$ 0,962)
Luz tubular	3,977 ($\pm$ 1,113)	2,047 ($\pm$ 0,440)	4,133 ($\pm$ 0,889)
Túnica própria	4,857 ($\pm$ 0,562)	4,767 ($\pm$ 0,497)	3,640 ($\pm$ 0,360)

TABELA 3 – Percentual volumétrico médio ($\pm$ erro padrão da média) do compartimento intertubular e dos componentes do compartimento intertubular das regiões anterior, média e posterior dos testículos de *P. lineatus*.

	Anterior (%)	Média (%)	Posterior (%)
Compartimento intertubular	10,048 ($\pm$ 3,048)	9,632 ($\pm$ 1,336)	12,859 ($\pm$ 2,024)
Células de Leydig	0,873 ($\pm$ 0,243)	0,904 ($\pm$ 0,114)	0,977 ($\pm$ 0,106)
Vaso sanguíneo	1,204 ($\pm$ 0,275)	0,805 ($\pm$ 0,044)	1,537 ($\pm$ 0,299)
Tecido conjuntivo	7,970 ($\pm$ 2,552)	7,921 ($\pm$ 1,295)	10,344 ($\pm$ 1,872)

5.3 Análise estatística do diâmetro nuclear das células germinativas estimado durante a espermatogênese

Quando comparados estatisticamente os diâmetros nuclear de todos os tipos de células germinativas, a variação entre eles ocorreu ($F = 3618,508 / p < 0,001$ - FIGURA 19). Assim, o valor médio de cada classe pode ser utilizado como um parâmetro para a determinação destes tipos de células, uma vez que comparando classes subsequentes, a diferença entre as variâncias permanecem em maior ou menor grau ($t_{SG1-SG2}=18,389$; $t_{SG2-PL}=50,110$; $t_{PL-LZ}=-41,316$; $t_{LZ-P}=8,463$; $t_{P-D}=8,388$; $t_{D-SS}=27,540$; $t_{SS-S1}=28,519$; $t_{S1-S2}=32,199$; $t_{S2-S3}=23,114$; $t_{S3-SPZ}=11,857$; [$p<0.001$]. SG1, espermatogônias primárias; SG2, espermatogônias secundárias; PL, espermatócitos primários em pré-leptóteno; LZ, espermatócitos primários em leptóteno / zigóteno; P, espermatócitos primários em paquíteno; D, espermatócitos primários em diplóteno; SS, espermatócitos secundários; S1, espermátide inicial; S2, espermátide intermediária; S3, espermátide final; SPZ, espermatozoides.

FIGURA 19 – VARIAÇÃO DO DIÂMETRO NUCLEAR DAS CÉLULAS GERMINATIVAS NOS TESTÍCULOS DE *P. lineatus* ($F = 3618,508 / p < 0,001$). Os valores do diâmetro nuclear podem ser utilizados como um parâmetro para a determinação destes tipos de células ($t_{SG1-SG2} = 18,389$; $t_{SG2-PL} = 50,110$; $t_{PL-LZ} = -41,316$; $t_{LZ-P} = 8,463$; $t_{P-D} = 8,388$; $t_{D-SS} = 27,540$; $t_{SS-S1} = 28,519$; $t_{S1-S2} = 32,199$; $t_{S2-S3} = 23,114$; $t_{S3-SPZ} = 11,857$; [$p < 0,001$]). Abreviações: SG1, espermatogônias primárias; SG2, espermatogônias secundárias; PL, espermatócitos primários em pré-leptóteno; LZ, espermatócitos primários em leptóteno / zigóteno; P, espermatócitos primários em paquíteno; D, espermatócitos primários em diplóteno; SS, espermatócitos secundários; S1, espermátide inicial; S2, espermátide intermediária; S3, espermátide final; SPZ, espermatozoides.

5.4 Análises morfométrica e estereológica da espermatogônia primária

Os volumes celular e nuclear da espermatogônia primária de *P. lineatus* estimados foram $1.252,00 \mu\text{m}^3$ e $413,00 \mu\text{m}^3$, respectivamente, enquanto o número médio de espermatogônias primárias estimado por testículos foi de aproximadamente 2,40 bilhões ($2,4 \times 10^6$) (TABELA 4).

TABELA 4 – Morfometria e estereologia da espermatogônia primária em *Prochilodus lineatus*.

Parâmetro (n = 5)	Média ± Desvio padrão da média
Diâmetro nuclear da espermatogônia primária (μm)	9,22 ($\pm$ 0,29)
Volume da espermatogônia primária (μm^3)	1.252,00 ($\pm$ 70,46)
Porcentagem de citoplasma na célula	67,00 ($\pm$ 2,92)
Volume de citoplasma (μm^3)	840,00 ($\pm$ 68,19)
Porcentagem de núcleo na célula	33,00 ($\pm$ 2,92)
Volume nuclear (μm^3)	413,00 ($\pm$ 35,73)
Volume total (mL) ocupado pela espermatogônia primária nos testículos	0,003 ($\pm$ 0,001)
Número de espermatogônia primária por testículo ($\times 10^6$)	2,40 ($\pm$ 0,40)

5.5 Determinação da fase e da subfase reprodutiva nos testículos usados nas análises morfométrica e estereológica

A fase e a subfase no ciclo reprodutivo foram determinadas nos testículos de *P. lineatus* utilizados para as análises morfométrica e estereológica. Foi observada nas regiões anterior, média e posterior dos testículos, de todos os animais avaliados (n = 5), a presença de espermatozoides livres no ducto principal e no lúmen tubular (FIGURAS 20A e 20B), a presença de todos os estágios da espermatogênese (espermatogônias primárias e secundárias, espermátocitos primários e secundários e espermátides) distribuídos por todo os testículos (FIGURA 20B). Com base nestes resultados e considerando-se os critérios morfológico e histológico propostos para distinguir as fases reprodutivas de Brown-Peterson et al. (2011), os testículos de todos os animais avaliados encontravam-se na Fase Apto para Reprodução. Além disso, tendo-se como base a estrutura do epitélio germinativo, os testículos apresentaram epitélio germinativo contínuo nos espermatocistos na periferia dos testículos, e epitélio germinativo descontínuo nos túbulos próximos ao ducto principal. Sendo assim, os testículos de *P. lineatus* se encontravam na subfase de Epitélio Germinativo Médio.

FIGURA 20 – ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS TESTÍCULOS DE *P. lineatus*. **A** – Túnica albugínea (TA), ducto principal, localizado dorsalmente com espermatozoides e luz tubular repleto de espermatozoides (seta preta). **B** – Observar túbulos seminíferos mostrando cistos com células germinativas em diferentes estágios de maturação: espermatogônias (sg), espermatócitos primários (oc), espermatídes (st) e espermatozoides (SPZ) no lúmen tubular. Corte transversal do testículo. P.A.S. + Hematoxilina Férrica+ *Metanil yellow*. Barras = 300 μ m em A e 50 μ m em B.

5.6 Imunoperoxidase com anti-OCT4, anti-GFR α 1 e anti-Vasa aplicada aos testículos

Os fragmentos de testículos selecionados para a avaliação imuno-histoquímica que foram fixados em Bouin e Methacarn e incubados com o anticorpo primário anti-GFR α 1 se mostraram melhor marcados com Methacarn, embora a marcação observada tenha sido fraca. Observamos marcação fraca de membrana e citoplasma em espermatogônias primárias e secundárias (FIGURA 21A). Nos controles negativos dos testículos não observamos marcação contra este anticorpo (FIGURA 21B).

FIGURA 21 – IMUNOPEROXIDASE COM ANTI- GFR α 1 NOS TESTÍCULOS DE *Prochilodus lineatus*. **A** – Marcação do anticorpo primário nas espermatogônias primárias (*Inset*) e secundárias (seta). **B** – Controle negativo para anti-GFR α 1 sem marcação.

Verificamos que o material incubado com anti-Vasa que foi fixado em Bouin e Methacarn se mostrou melhor marcado com Methacarn. A marcação contra este anticorpo foi no citoplasma das espermatogônias primárias, secundárias, espermatócitos e espermatídes. Apesar da marcação ter sido fraca, foi mais evidente nas células germinativas mais indiferenciadas, como espermatogônias, diminuindo nas células germinativas mais avançadas (FIGURA 22A). Nos controles negativos dos testículos, não observamos marcação (FIGURA 22B).

FIGURA 22 – IMUNOPEROXIDASE COM ANTI-VASA NOS TESTÍCULOS DE *Prochilodus lineatus*. **A** – Marcação do anticorpo primário no citoplasma das células germinativas. Espermatogônias secundárias (seta); oc, espermatócitos primários; e, espermátides. **B** – Controle negativo para anti-Vasa sem marcação.

O material incubado com o anticorpo primário anti-OCT4, tanto o que foi fixado em Methacarn como em líquido de Bouin, não mostrou marcação nas espermatogônias primárias. Nos controles negativos dos testículos também não observamos marcação.

5.7 Método de obtenção das espermatogônias primárias

Os protocolos utilizados e padronizados para a obtenção de células germinativas no presente trabalho foram adaptações daqueles previamente descritos na literatura (BELLVÉ et al., 1977; LACERDA et al., 2008). Os resultados obtidos a partir destes protocolos sugerem que os mesmos foram eficientes para *P. lineatus*, pois pode-se separar os diferentes tipos celulares desejados, ou seja, espermatogônias (FIGURA 23), dentre as quais se encontravam aquelas que foram alvo maior de nosso interesse, as espermatogônias com características de células mais imaturas (espermatogônias primárias) de acordo com o descrito na literatura (LACERDA et al., 2008; SCHULZ et al., 2005). Pode-se separar na interface dos gradientes da coluna de Percoll (10%, 20%, 30% e 40%) 3 camadas celulares distintas e o *pellet*. As duas camadas superiores apresentaram grande concentração de espermatogônias primárias (FIGURAS 23A e 23B). O estudo ultraestrutural confirmou a presença deste tipo celular obtido na coluna de Percoll (FIGURA 23E). A terceira camada apresentou células de tamanho menor, como espermatócitos e espermátides (FIGURA 23C), e no *pellet* celular concentraram-se hemácias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides (FIGURA 23D).

Os resultados da separação nos mostraram que as duas camadas superiores apresentaram uma suspensão celular heterogênea. Foram encontradas espermatogônias diferenciadas, espermatócitos, espermátides, espermatozoides e células de Sertoli (com

muitos grânulos citoplasmáticos – fagossomos). Também deve ser ressaltado que, através da análise morfológica das células germinativas selecionadas e da utilização do azul de tripan, os protocolos utilizados resultaram em grande número de células germinativas viáveis, 90,75%. A camada 3 inferior e o pellet localizado abaixo da mesma foram descartados por apresentarem predominantemente espermátocitos e espermátides (camada inferior) e hemácias, espermatozoides e restos celulares (*pellet*) (FIGURAS 23C e 23D).

FIGURA 23 – SEPARAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS DE *Prochilodus lineatus* EM GRADIENTE DE PERCOLL. Observa-se no tubo da coluna de Percoll a presença de quatro bandas celulares distintas (10%, 20%, 30% e 40%). As duas bandas superiores (A e B) apresentaram maior concentração de espermatogônias primárias (setas). À direita de A e B (E), uma espermatogônia primária, com cromatina descondensada e nucléolo evidente. Microscopia eletrônica de transmissão. Barra = 5 μ m. A banda celular inferior (C) apresentou células de tamanho menor, como espermátocitos e espermátides, e no *pellet* celular (D) concentraram-se hemácias, espermátocitos, espermátides e espermatozoides. As células foram fixadas, incluídas em resina Spurr e coradas com azul de toluidina. Barra = 20 μ m em A–D.

5.8 Plaqueamento diferencial por adesão das células germinativas após Percoll

Os resultados obtidos a partir do protocolo para seleção de espermatogônias por meio de plaqueamento diferencial por adesão sugerem que o mesmo foi eficiente para enriquecer o meio de cultivo com espermatogônias. Após o cultivo por um curto período de tempo (14 – 17 horas), as células somáticas dos testículos de *P. lineatus* tiveram a capacidade de se aderir totalmente à placa de cultura (FIGURA 24B). Desta forma, coletando as células livres, conseguimos enriquecer a suspensão celular a ser cultivada com os tipos celulares desejados, ou seja, espermatogônias com características de células mais imaturas, como tamanho grande, cor homogênea e citoplasma sem granulações. As células que ficaram aderidas foram quase que exclusivamente células somáticas, sugestivas de células de Sertoli (FIGURAS 24C e 24D), pois apresentaram forma estrelada e espraçada, com muitas partículas citoplasmáticas lucentes resultantes de substâncias fagocitadas por estas células. Raramente se observaram espermatogônias aderidas junto com as células somáticas, comprovando que o meio com espermatogônias foi enriquecido. Embora uma quantidade substancial de células somáticas e outras células germinativas mais avançadas foram descontaminadas da suspensão celular, a completa remoção ainda não pôde ser alcançada com esta técnica.

FIGURA 24 – PLAQUEAMENTO DIFERENCIAL POR ADESÃO DE CÉLULAS TESTICULARES DE *Prochilodus lineatus*. **A** – Células plaqueadas após separação com Percoll mostrando a presença de muitos tipos celulares. Espermatogônias primárias (setas preta); células somáticas (setas branca). **B** – Após 14 horas de cultivo, observa-se a presença de eventuais células somáticas (fusiformes ou estreladas) que se aderem à placa de cultura (setas brancas). As células germinativas, principalmente espermatogônias, permanecem livres no meio (setas preta). **C e D** – Células somáticas (alongadas e/ou com partículas citoplasmáticas) que ficaram aderidas após o plaqueamento diferencial por adesão. Barra em A-D = 30 µm.

5.9 Cultivo primário das espermatogônias primárias

Após a realização do plaqueamento diferencial por adesão, as células livres coletadas foram plaqueadas no dia 0 (FIGURA 25A) em placa de cultura de 24 poços cobertas com lamínulas de vidro pré-tratadas com gelatina bovina 0,1% e analisadas a cada 24 horas.

Dois tipos de tratamentos foram realizados. No primeiro, as células foram suplementadas com meio de cultura preparado para proliferação celular. No segundo, as células foram suplementadas com meio de cultura preparado para diferenciação celular. Em ambos os tratamentos, foi analisada a progressão das células em cultivo com e sem troca do meio durante o período de cultivo. Ainda se ressalta que as amostras que receberam meio para diferenciação celular foram comparadas quanto à presença e ausência do Extrato embrionário de peixe de embriões de 7 dias de *Prochilodus lineatus* (EEPI) no meio de cultura.

Nas amostras contendo meio de cultura para proliferação celular e que não tiveram o meio trocado, observou-se, em análise qualitativa microscópica, maior número de células e maior proliferação celular durante todo o tempo de cultivo, comparado com as amostras em que tiveram a metade do meio trocado a cada três dias. Nestas amostras, com 48 horas de cultivo, as células somáticas apresentaram forma alongada, e as espermatogônias foram observadas em divisão. Em três dias (FIGURA 25B), o número e o tamanho das células somáticas alongadas aumentou drasticamente e teve início ao aparecimento de pequenos aglomerados celulares sugestivos de células germinativas e, aparentemente, em proliferação, e fracamente aderidos às células somáticas. Estas características foram observadas nas amostras com e sem troca do meio de cultura (FIGURAS 25B e 26A).

Com seis dias de cultivo, observou-se ainda nestas amostras que as células somáticas se expandiram mais, em tamanho e em número, e os aglomerados celulares se proliferaram mais mostrando tamanho aumentado, e estes foram observados fracamente aderidos às células somáticas (FIGURA 26B). Nas amostras em que a metade do meio de cultura foi trocado, se observou após a troca uma diminuição do número de aglomerados celulares e do tamanho dos mesmos, assim como o número de células somáticas também foi reduzido (FIGURA 25C). Provavelmente o processo de retirada do meio fez com que as células somáticas e os aglomerados sugestivos de células germinativas que estavam fracamente aderidos fossem removidos junto com o meio, diminuindo o número de células e dificultando o processo de proliferação celular.

Com oito dias, nas amostras em que não tiveram o meio de cultura trocado, as características se intensificaram ainda mais em número e em proporção e a placa começou a apresentar área de confluência entre as células mostrando intenso processo de proliferação dos aglomerados celulares que continuavam fracamente aderidos sobre as células somáticas (FIGURAS 26C e 26D). Nas amostras em que tiveram o meio trocado, observou-se que, aparentemente, o número de células continuava diminuído e somente alguns aglomerados de células foram observados (FIGURA 25D).

Com nove dias, nas amostras em que não tiveram o meio de cultura trocado, as células somáticas se apresentaram extremamente espalhadas e o espalhamento, por ser muito alongado, se organizou em círculos com a presença de muitos aglomerados celulares sugestivos de células germinativas fracamente aderidos a eles (FIGURAS 26E e 26F). Nas amostras em que o meio de cultura foi trocado, observou-se um aumento do espalhamento das células somáticas e um aumento dos aglomerados celulares, mas ainda muitas células isoladas

com características morfológicas de espermatogônias foram observadas (FIGURAS 25E e 25F).

Com treze dias de cultivo, nas amostras em que não tiveram o meio de cultura trocado, a proliferação das células pareceu estar mais intensa, pois pudemos observar áreas com aglomerados celulares de grande proporção próximos uns dos outros e fracamente aderidos às células somáticas. Já, nas amostras em que o meio de cultura foi trocado, embora em pequena proporção, observou-se a presença de aglomerados celulares e células somáticas espaiadas.

Com quinze dias de cultivo, nas amostras em que não tiveram o meio de cultura trocado, todas as características citadas acima continuaram presentes mostrando contínua proliferação das células e os aglomerados, por serem de grande tamanho, tiveram a morfologia de grandes agregados celulares (FIGURAS 26G e 26H). Nas amostras em que o meio de cultura foi trocado, não houve alteração no que diz respeito às características já citadas. O resumo do cultivo primário das células encontra-se descrito na TABELA 5.

TABELA 5 – Resumo do cultivo primário das células de *Prochilodus lineatus* com meio de cultura para proliferação celular.

Células cultivadas com meio de cultura para proliferação celular		
	Sem troca de meio de cultura	Com troca de meio de cultura
48 horas	Células somáticas alongadas e espermatogônias em divisão.	-
3 dias	Aumento do espraçamento das células somáticas e aparecimento de pequenos aglomerados celulares sugestivos de espermatogônias.	-
6 dias	Expansão maior das células somáticas e proliferação dos aglomerados celulares.	Diminuição das células somáticas e de aglomerados celulares.
8 dias	Aparecimento de áreas de confluência dos aglomerados celulares.	Número diminuído de células somáticas e de aglomerados se manteve.
9 dias	Células somáticas extremamente espaiadas e muito aglomerados.	Aumento do espraçamento das células somáticas e dos aglomerados.
13 dias	Proliferação mais intensa dos aglomerados celulares.	Presença de poucos e pequenos aglomerados celulares.
15 dias	Características citadas se mantiveram.	Características citadas se mantiveram.

FIGURA 25 – CULTIVO PRIMÁRIO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE *Prochilodus lineatus* COM MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR COM TROCA DO MEIO DE CULTURA. **A** - No dia 0, observaram-se células exclusivamente isoladas. Seta cheia preta, espermatogônias primárias; Seta cheia branca, células somáticas (Sertoli). **B** - Com 3 dias, iniciou o aparecimento de pequenos aglomerados celulares e do espraçamento das células somáticas. **C** - No dia 6, houve diminuição do número de células. **D** - No dia 8, o número de células continuou diminuído assim como o de aglomerados. **E-F** - No dia 9, houve um aumento do espraçamento das células somáticas e dos aglomerados celulares, mas ainda se observaram muitas células isoladas com características de espermatogônias (seta cheia preta) e células somáticas redondas com muitas partículas citoplasmáticas lucentes. Seta fina, células somáticas (Sertoli); Seta grossa, cachos celulares, sugestivos de espermatogônias. Barra em A, B, C e F = 30 μ m e em D e E = 100 μ m.

FIGURA 26 – CULTIVO PRIMÁRIO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE *Prochilodus lineatus* COM MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR E SEM TROCA DO MEIO DE CULTURA. **A** - Com 3 dias, iniciou o aparecimento de pequenos aglomerados celulares e do espraio das células somáticas. **B** - No dia 6, os aglomerados celulares apareceram maiores. **C-D** - No dia 8, o número de aglomerados celulares aumentou. **E-F** - No dia 9, as células somáticas exibiram um grande espraio. **G-H** - Com 15 dias, os aglomerados celulares, em grande número, apresentaram formato de grandes agregados celulares. Seta fina, células somáticas (Sertoli); Seta grossa, cachos celulares, sugestivos de espermatogônias primárias. Barra em A, B, D, F e H = 30 µm e em C, E e G = 100 µm.

Nas amostras contendo meio de cultura para diferenciação celular, em análise microscópica, aparentemente, não se observou diferença entre as amostras que receberam o Extrato embrionário de peixe de embriões de 7 dias de *Prochilodus lineatus* (EEPI) e as amostras que não receberam o EEPI (FIGURAS 27, 28 e 29), assim como, não se observou diferença entre as amostras que não tiveram o meio trocado e as que tiveram o meio trocado após 7 dias de cultivo (FIGURAS 28 e 29).

Nestas culturas, foi observado que, em 48 horas de cultivo, as células somáticas iniciaram o processo de espraio, e a maioria das espermatogônias permaneceram isoladas como no dia 0 de cultivo, e raramente se observou a presença de aglomerados celulares.

Em 4 dias de cultivo, a ocorrência marcante foi o aparecimento de uma massa celular compacta centralmente, sugestiva de células germinativas em proliferação, cercada por muitas células germinativas e somáticas isoladas. Algumas células germinativas sugestivas de espermatogônias foram observadas em divisão. Observou-se também a presença de muitas células somáticas (células de Sertoli) espraídas, mas raramente a presença de aglomerados celulares (dados não mostrados).

Em 8 dias de cultivo, e em poucas amostras, observaram-se pequenos aglomerados celulares sugestivos de células germinativas que estavam fracamente aderidos às células somáticas (FIGURA 27, C-F) mas a maioria das células se dispunham isoladas, geralmente em torno de células somáticas, exceto nos locais onde se observou uma massa celular compacta centralmente, sugestiva de células germinativas, com muitas células somáticas espraídas e germinativas isoladas envolvendo-a (FIGURA 27, B e D). Observaram-se também através da placa muitas células somáticas alongadas (FIGURAS 27C, 27E e 27F), mas ainda havia muitas arredondadas, de tamanho grande e com muitas partículas citoplasmáticas lucentes presentes, provavelmente fagossomos das células de Sertoli (FIGURA 27F).

Com 13 dias de cultivo, o espraio das células somáticas se mostrou muito desenvolvido, e a massa celular compacta centralmente não só estava presente nas culturas,

como houve um aumento do número destas estruturas com muitas células isoladas (somáticas e germinativas) envolvendo-as. Poucos aglomerados celulares sugestivos de células germinativas foram observados nas culturas. Com 15 dias de cultivo, aparentemente, todas as características citadas acima permaneceram presentes nas culturas celulares, sem alguma alteração (FIGURAS 28 e 29). O resumo do cultivo primário das células encontra-se descrito na TABELA 6.

TABELA 6 – Resumo do cultivo primário das células de *Prochilodus lineatus* com meio de cultura para diferenciação celular.

Células cultivadas com meio de cultura para diferenciação celular	
Com e sem EEPI, sem e com troca de meio de cultura	
48 horas	Início do espraimento das células somáticas e espermatogônias isoladas.
4 dias	Aparecimento de uma massa celular compacta centralmente, sugestiva de células germinativas e algumas espermatogônias em divisão.
8 dias	Aparecimento de pequenos aglomerados celulares e muitas células somáticas alongadas e arredondadas.
13 dias	Espraimento das células somáticas muito desenvolvido, aumento das massas celulares compactas centralmente e poucos aglomerados celulares.
15 dias	Características citadas se mantiveram.

FIGURA 27 - CULTIVO PRIMÁRIO DE 8 DIAS DAS CÉLULAS CULTIVADAS COM MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR, TRATADAS COM EEPI E SEM EEPI. **A** - Células plaqueadas no dia 0 de cultivo. Células somáticas (setas branca). Espermatogônias primárias (setas preta). **B e C** - Células cultivadas com o EEPI. Em **B**, presença de uma massa celular envolvida por células isoladas. **C** - Um pequeno aglomerado celular sugestivo de células germinativas. **D-F** - Células cultivadas sem o EEPI. Em **D**, presença de uma massa celular (superior) com muitas células somáticas espraídas e células germinativas isoladas em torno. Um pequeno aglomerado de células germinativas (inferior). **E e F** - Aglomerado celular próximo às células somáticas. Seta fina, células somáticas (Sertoli); Seta grossa, aglomerados celulares, sugestivos de espermatogônias primárias. Barras em B e D = 100 µm e em A, C, E e F = 30 µm.

FIGURA 28 - CULTIVO PRIMÁRIO DE 15 DIAS DAS CÉLULAS CULTIVADAS COM MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR, TRATADAS COM EEPl, COM E SEM TROCA DO MEIO DE CULTURA. **A** e **B** - Observar pequenos aglomerados de células sugestivos de células germinativas, próximos às células somáticas espreiadas ou fracamente aderidos a elas. **C** e **D** - Presença de aglomerados celulares na cultura. Seta fina, células somáticas (célula de Sertoli); Seta grossa, aglomerados celulares, sugestivos de espermatogônias primárias. Barra em C = 100 μm , em A, B, e D = 30 μm .

FIGURA 29 - CULTIVO PRIMÁRIO DE 15 DIAS DAS CÉLULAS CULTIVADAS COM MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR, NÃO TRATADAS COM EEPl, COM E SEM TROCA DO MEIO DE CULTURA. **A** - Células somáticas arredondadas e com partículas citoplasmáticas lucentes e células somáticas espalhadas. **B** - Massa celular envolvida por muitas células, somáticas espalhadas (setas finas) e germinativas isoladas. **C** e **D** - Aglomerados sugestivos de células germinativas. Barra em A, C, e D = 30 µm e em B = 100 µm.

5.10 Método de imunofluorescência das células cultivadas

As células cultivadas foram coletadas, fixadas e submetidas a análise pelo método de imunofluorescência para serem caracterizadas. Observou-se, durante o tempo de cultivo nas amostras que receberam o meio de cultura para proliferação celular, muitos aglomerados celulares, até então sugestivos de células germinativas, mais especificamente de espermatogônias primárias. A identidade destas células foi confirmada com o estudo de imunofluorescência, em que se observou marcação citoplasmática, como descrito nas especificações do produto, de cor verde, com o anticorpo primário anti-vasa, (FIGURAS 30A, 30B e 30E), que é um marcador de células germinativas, e mais especificamente, observou-se marcação de membrana e de citoplasma, como descrito nas especificações do produto, de cor verde, com o anticorpo anti-GFR α 1 (FIGURAS 31A, 31B e 31E), que é um marcador que

pode ser usado para caracterizar e selecionar as células tronco espermatogoniais. Em todas as amostras marcadas, as células estavam dispostas em grupos, e esta característica confirma a identidade dos aglomerados celulares observados durante o cultivo que aumentaram em número e em tamanho com o decorrer da cultura. Nas amostras controle, que não foram tratadas com os anticorpos primários, não se observaram as marcações positivas citadas anteriormente (FIGURAS 30C, 30D, 31C e 31D).

Observou-se marcação citoplasmática, em verde, com o anticorpo primário anti-vasa, nas células que receberam meio de cultura sugestivo para diferenciação celular (FIGURAS 33A, 33B e 33E), caracterizando a presença das células germinativas. Nos grupos controle, não se observaram marcações positivas (FIGURAS 33C e 33D).

Outra marcação observada nas células cultivadas com meio de cultura para proliferação celular, foi com o anticorpo primário anti-OCT4 (Abcam), que é um marcador de células tronco pluripotentes e germinativas primordiais. A marcação observada de cor verde foi nuclear, como indicado nas especificações do produto (FIGURAS 32A e 32B). As amostras controle que não receberam o anticorpo primário não apresentam nenhum tipo de marcação positiva (FIGURAS 32C e 32D). Assim, a marcação deste anticorpo sugere que as espermatogônias primárias presentes na cultura de *Prochilodus lineatus* podem ser consideradas células tronco pluripotentes. Não foi possível identificar com precisão se as células marcadas estavam dispostas em aglomerados ou isoladas, mas observou-se muitas células com marcação positiva dispostas muito próximas umas das outras. Nas células que foram cultivadas com meio de cultura para diferenciação celular, também se observou marcação de citoplasma, em verde, com o anticorpo primário anti-Vasa (FIGURAS 34B, 34G e 34H) e nuclear, em vermelho, com o anticorpo primário anti-OCT4 (Millipore) (FIGURAS 34C e 34H), confirmando que as espermatogônias, consideradas células tronco pluripotentes, estavam presentes na cultura de *Prochilodus lineatus*. Nos grupos controle que não receberam o anticorpo primário, não se observaram marcações positivas (FIGURAS 34E e 34F).

Os aglomerados de espermatogônias primárias, identificados aqui com o método de imunofluorescência, foram observados nitidamente em análise qualitativa durante o cultivo, mostrando estar em processo ativo de proliferação celular. As análises de imunofluorescência realizadas aqui não puderam confirmar a proliferação observada no cultivo, pois não se observou marcação com o anticorpo anti-BrdU em nenhuma amostra das culturas celulares realizadas. Supomos que a aplicação do BrdU somente uma vez no dia 0, protocolo proposto por Sasaki et al. (2005), não permitiu a estabilidade do componente nas células a cada divisão após a incorporação do mesmo na fase S do ciclo celular. Sugere-se que a aplicação seja feita

em vários pulsos durante o cultivo e momentos antes da coleta das células. Além disso, a diferenciação celular durante o período de cultivo também não pôde ser avaliada, pelo mesmo motivo, de não observarmos marcação do anticorpo anti-BrdU. As células mais diferenciadas e, supostamente, os espermatozoides que eventualmente se formaram durante o cultivo não puderam ser identificados pelo método de imunofluorescência com o anticorpo anti-BrdU. Supostamente, se estas células tivessem sido marcadas com o anti-BrdU, elas teriam sido diferenciadas no cultivo a partir das espermatogônias primárias que incorporaram o BrdU.

FIGURA 30 - MÉTODO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA COM O ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-VASA DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 8 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR HAVENDO TROCA DO MEIO DE CULTURA. **A** - Marcação nuclear das células com Dapi (tratadas com o anti-Vasa). **B** - Marcação citoplasmática com anti-Vasa, em verde, de aglomerados de células germinativas. **C** - Marcação nuclear das células controle com Dapi. **D** - Não se observou marcação em verde no controle. **E** - Sobreposição das figuras A e B (Dapi e anti-Vasa). Barras em A-E = 50 μ m.

FIGURA 31 - MÉTODO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA COM O ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-GFR α 1 DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 3 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR HAVENDO TROCA DO MEIO DE CULTURA. **A** - Marcação nuclear das células com Dapi (tratadas com anti-GFR α 1). **B** - Marcação de membrana e citoplasma com o anti-GFR α 1, em verde, de cachos de células germinativas. **C** - Marcação nuclear das células controle com Dapi. **D** - Não se observou marcação em verde no controle. **E** - Sobreposição das figuras A e B (Dapi e anti-GFR α 1). Barras em A-E = 50 μ m.

FIGURA 32 - MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM O ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-OCT4 DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 15 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR SEM TROCA DO MEIO DE CULTURA. **A** - Marcação nuclear das células com Dapi (tratadas com anti-OCT4). **B** - Marcação nuclear com anti-OCT4, em verde, das espermatogônias primárias. **C** - Marcação nuclear das células controle com Dapi. **D** - Não se observou marcação em verde no controle. Barras em A-D = 50 μ m.

FIGURA 33 - MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM O ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-VASA DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 8 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR SEM O EXTRATO EMBRIONÁRIO DE *Prochilodus lineatus*. **A** - Marcação nuclear das células com Dapi (tratadas com anti-Vasa). **B** - Marcação citoplasmática com anti-Vasa, em verde. **C** - Marcação nuclear das células controle com Dapi. **D** - Não se observou marcação em verde no controle. **E** - Sobreposição das figuras A e B (Dapi e anti-Vasa). Barras em A-E = 50 μ m.

FIGURA 34 - DUPLA MARCAÇÃO PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM OS ANTICORPOS PRIMÁRIOS ANTI-VASA/OCT4 DAS CÉLULAS CULTIVADAS POR 8 DIAS COM O MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAÇÃO CELULAR SEM O EXTRATO EMBRIONÁRIO DE *Prochilodus lineatus*. **A** - Marcação nuclear das células com Dapi (tratadas com anti-Vasa/OCT4). **B** - Marcação citoplasmática em verde com anti-Vasa, das células germinativas. **C** - Marcação nuclear em vermelho com anti-OCT4, das espermatogônias primárias. **D** - Marcação nuclear das células controle com Dapi. **E** e **F** - Não se observou marcação em verde e em vermelho nos controles. **G** - Sobreposição das figuras A e B (Dapi e anti-Vasa). **H** - Sobreposição das figuras A, B e C (Dapi, anti-Vasa e anti-OCT4). Barras em A-H = 50 µm.

5.11 Separação das espermatogônias primárias por citometria de fluxo – *Cell sorting*

As células germinativas foram separadas através do *Cell Sorting*, por citometria de fluxo, para eliminar as células somáticas e células germinativas mais avançadas e, enriquecer o meio de cultura com espermatogônias primárias. A separação das células com Percoll não permitiu a separação das células com total eficácia, deixando contaminação com células somáticas e outras células germinativas mais avançadas nas duas camadas superiores da coluna de Percoll.

Foi utilizada como referência a metodologia descrita por Kise et al. (2012), que separaram as espermatogônias primárias através do *Cell sorting* somente por tamanho e granularidade, sem algum tipo de marcação, para enriquecer o meio de cultura com estas células, e obtiveram um rendimento de 94% de pureza.

Para esta etapa, duas amostras foram utilizadas: células oriundas da digestão enzimática dos testículos sem Percoll, e células oriundas das duas camadas superiores da coluna de Percoll (por apresentarem maior concentração de espermatogônias primárias). Antes da separação, as células foram analisadas e fotografadas com 12 horas de cultivo (FIGURAS 35A e 35B). Determinou-se quatro *gates* em um histograma bi-dimensional produzido usando os valores de tamanho e granularidade, para as duas amostras, sem Percoll (FIGURAS 36A e 36B) e com Percoll (FIGURA 39), sendo que dentro de cada *gate* encontrava-se uma população diferente (P2, P3, P4 e P5). Após a separação das amostras, foi verificada a pureza, o número de células e analisada a morfologia das células.

FIGURA 35 – VISUALIZAÇÃO DAS CÉLULAS COM 12 HORAS DE CULTIVO, ANTES DA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO. **A** – Células oriundas das duas camadas superiores da coluna de Percoll. Observaram-se vários tipos celulares, de tamanhos distintos. As células grandes e redondas são candidatas às espermatogônias primárias (setas pretas). **B** – Células oriundas da digestão enzimática, sem o Percoll. O grande número de células presentes na suspensão dificultou a visualização das mesmas ao microscópio. Microscópio de Luz Invertido. Barra em A e B = 30 µm.

Na amostra oriunda da digestão enzimática, sem o Percoll, a análise da morfologia de P2 revelou uma grande concentração de células pequenas e pouco granulosas, com características morfológicas de espermátides e espermatozoides (FIGURAS 36A e 37A). Em P3, observaram-se células de tamanho pequeno e pouco granulosas, com características morfológicas de espermatogônias secundárias e espermatócitos (FIGURAS 36A e 37B). Em P4, houve predominância de células com núcleos grandes e citoplasma abundante e sem granulações, caracterizando as espermatogônias primárias (FIGURAS 36A e 37C). Em P5, observaram-se muitos debrís celulares (FIGURAS 36A e 37D). Em P4 e P5, observou-se uma grande quantidade de hemácias em comparação às outras populações celulares (FIGURAS 37C e 37D).

Da mesma amostra sem o Percoll, procurou-se restringir o *gate* da população P4 para eliminar ainda mais possíveis contaminações com outros tipos celulares a fim de obter uma população homogênea e rica em espermatogônias primárias. Separou-se esta população que recebeu o nome de P4 “restrita” (FIGURA 36B). Ao analisar a morfologia destas células (FIGURA 38), observou-se maior homogeneidade entre as células em relação ao tamanho e à granularidade em comparação a P4 não restrita. Apresentaram tamanho grande e sem granulações citoplasmáticas, ou seja, caracterizando as espermatogônias primárias. Contudo, observou-se uma grande quantidade de hemácias entre estas células.

A pureza e o número de células obtidos de todas as amostras, em todas as populações celulares, após a realização do método de separação celular, podem ser visualizados na TABELA 7.

TABELA 7 - Pureza e número de células obtidos nas diferentes populações celulares oriundas da digestão enzimática, sem o Percoll, após a separação por citometria de fluxo.

POPULAÇÃO	PUREZA	NÚMERO DE CÉLULAS/mL
P2	81%	$3,4 \times 10^6$
P3	42,5%	$9,03 \times 10^5$
P4	61,8%	$2,7 \times 10^6$
P5	70,2%	$2,27 \times 10^6$
P4 "restrita"	74,5%	$6,0 \times 10^5$

FIGURA 36 – POPULAÇÕES CELULARES ORIUNDAS DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA, SEM O PERCOLL E QUE FORAM SEPARADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. **A** – Desenho de 4 *gates*, correspondendo às 4 populações celulares existentes (P2, P3, P4 e P5) que foram separadas. P2, com células pequenas e pouco granulosas, P3, contendo células de tamanho intermediário e pouco granulosas. P4, contendo as maiores células e com pouca granularidade, candidatas a espermatogônias primárias. P5, contendo células grandes e muito granulosas, provavelmente células de Sertoli. **B** – P4 “restrita”, contendo as maiores células e com pouca granularidade, candidatas a espermatogônias primárias. FSC-A, tamanho. SSC-A, granularidade.

FIGURA 37 – MORFOLOGIA DAS QUATRO POPULAÇÕES CELULARES SEPARADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO, ORIUNDAS DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA, SEM O PERCOLL. **A** – Observaram-se em P2 células pequenas, provavelmente espermátides e espermatozoides. **B** – Em P3, células pequenas, provavelmente espermatócitos e espermatogônias secundárias menores. **C** – Em P4, células com núcleo grande e citoplasma abundante e sem granulações, provavelmente espermatogônias primárias (setas preta). Observaram-se hemácias. **D** – Debrís celulares em P5 e espermatogônias primárias (setas preta). Barra em A-D = 30 μm e *Inset* em C = 15 μm .

FIGURA 38 – MORFOLOGIA DA P4 “RESTRITA” SEPARADA POR CITOMETRIA DE FLUXO, ORIUNDA DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA, SEM PERCOLL. Esta população foi separada de um *gate* mais restrito (menor) do que a P4 anterior. Observou-se um rendimento melhor da separação das células, com maior grau de pureza. Porém, muitas hemácias foram observadas. Barra = 30 μm e *Inset* = 10 μm .

Nas populações celulares oriundas das duas camadas superiores da coluna de Percoll foi revelado que P2 apresentou células pequenas e pouco granulosas, com características morfológicas de espermátides e espermatozoides (FIGURAS 39 e 40A). A P3, apresentou células de tamanho intermediário e pouco granulosas, provavelmente espermatócitos e espermatogônias secundárias menores (FIGURAS 39 e 40B). A P4 mostrou as maiores células, com núcleo grande e citoplasma abundante e sem granulações, supostamente espermatogônias primárias (FIGURAS 39 e 40C). Para esta população, a qual é considerada de interesse por apresentar espermatogônias primárias, considera-se necessário restringir mais o *gate* para obter uma taxa de pureza maior. Em P5, observaram-se células de tamanhos variados, sendo a maioria de tamanho menor do que em P4 e muitos debrís celulares (FIGURAS 39 e 40D). Não foram observadas hemácias em nenhuma das populações avaliadas, o que consideramos um enriquecimento melhor para a amostra que foi separada previamente com o Percoll.

A pureza e o número de células obtidos em todas as populações celulares após a realização do método de separação celular podem ser visualizados na TABELA 8.

TABELA 8 - Pureza e número de células obtidos nas diferentes populações celulares oriundas do Percoll após a separação por citometria de fluxo.

POPULAÇÃO	PUREZA	NÚMERO DE CÉLULAS/mL
P2	93%	$8,6 \times 10^5$
P3	49,2%	$1,6 \times 10^5$
P4	28,1%	$2,7 \times 10^5$
P5	70,1%	$1,7 \times 10^6$

FIGURA 39 – POPULAÇÕES CELULARES ORIUNDAS DAS DUAS CAMADAS SUPERIORES DA COLUNA DE PERCOLL (CAMADAS 1 E 2) E QUE FORAM SEPARADAS PELO CITÔMETRO DE FLUXO. Desenho de 4 *gates*, correspondendo às 4 populações celulares existentes (P2, P3, P4 e P5). P2, com células pequenas e pouco granulosas. P3, contendo células de tamanho intermediário e pouco granulosas. P4, contendo as maiores células e com pouca granularidade, candidatas a espermatogônias primárias. P5, contendo células pequenas e grandes e muito granulosas, provavelmente células de Sertoli. FSC-A, tamanho. SSC-A, granularidade.

FIGURA 40 – MORFOLOGIA DAS QUATRO POPULAÇÕES CELULARES SEPARADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO (P2, P3, P4 E P5), ORIUNDAS DAS DUAS CAMADAS SUPERIORES DA COLUNA DE PERCOLL. **A** – Observaram-se em P2 células muito pequenas, provavelmente, espermátides e espermatozoides. **B** – Em P3, células de tamanho intermediário, provavelmente espermátogônias secundárias e espermátócitos. **C** – Em P4, células com núcleo grande e citoplasma abundante e sem granulações, provavelmente, espermátogônias primárias. **D** – Observaram-se em P5 células de tamanhos variados, mas menores que em P4 (células mais escuras) e muitos debrís celulares de coloração mais clara. Não foi observada a presença de hemácias em P2, P3, P4 e P5 com Percoll. Barra em A-D = 30 μm e *inset* em C = 10 μm .

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivos: 1. avaliar os testículos de *P. lineatus* adultos e identificar e caracterizar morfológicamente a espermatogônia primária e outras células germinativas por microscopia de luz, histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão; 2. estimar o diâmetro nuclear das células germinativas durante a espermatogênese através de análise morfométrica; 3. avaliar a proporção volumétrica nos testículos que são ocupadas por espermatogônia primária e outras estruturas dos compartimentos tubular e intertubular englobando as regiões anterior, média e posterior dos testículos; 4. avaliar o volume ocupado por cada espermatogônia para estimar o número médio dessas células por testículo, por análises estereológica e morfométrica; 5. determinar a fase e a subfase no ciclo reprodutivo nos testículos dos animais utilizados para as análises morfométrica e estereológica; 6. padronizar métodos para obter e isolar espermatogônias primárias, na tentativa de posteriormente estabelecer protocolos para manter estas células *in vitro*.

6.1 Caracterização dos testículos e dos compartimentos tubular e intertubular

Existe similaridade estrutural na distribuição, morfologia e existência dos componentes do compartimento intertubular entre os testículos de teleósteos e mamíferos (GRIER, 1981). Os testículos de *P. lineatus* seguem os padrões da maioria dos teleósteos (ALEXANDRINO; TOKUMARU; PINHEIRO, 1985; ALVARENGA; FRANÇA, 2009; BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006; BROWN-PETERSON et al., 2011; KAVAMOTO; NARAHARA; ANDRADE-TALMELLI, 1998; MATTA et al., 2002; RESENDE et al., 1996; VILELA et al., 2003), como estruturas pares e alongadas, livres na porção anterior e média, e fundindo-se na região posterior, formando um ducto espermático comum (ALEXANDRINO; TOKUMARU; PINHEIRO, 1985; BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006; FISHELSON; DELAREA; GON, 2006; KAVAMOTO; NARAHARA; ANDRADE-TALMELLI, 1998; KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002; QUAGIO-GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999). Microscopicamente, apresentam-se revestidos pela túnica albugínea e, no interior, são formados pelos compartimentos intersticial (intertubular) e germinativo (tubular), padrão típico encontrado em vertebrados. O compartimento intersticial formado de tecido conjuntivo frouxo contém os mesmos componentes e com os mesmos padrões característicos encontrados em outras espécies de teleósteos, como células de Leydig, células mióides, fibroblastos e vasos sanguíneos distribuídos no tecido juntamente com fibras

colágenas (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006; CAUTY; LOIR, 1995; KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002; LO NOSTRO et al., 2004).

A estrutura testicular de *P. lineatus* foi caracterizada como tubular anastomosada, uma vez que apresenta túbulos seminíferos em planos transversais e longitudinais quando visto em corte transversal, mostrando que os túbulos formam uma rede intercomunicada por toda a região dos testículos. Esta característica foi descrita por Grier (1993) e, segundo Parenti e Grier (2004), este tipo de estrutura testicular é encontrada em teleósteos primitivos. Confirmando os estudos com *Prochilodus scrofa* (VICENTINI et al., 2001), os túbulos anastomosados de *P. lineatus* esvaziavam-se dorsalmente para o ducto principal desde a região anterior à posterior de ambos os testículos, onde se fusionavam formando um único ducto espermático, o qual se abria na papila urogenital. Diferente de *P. lineatus*, em *Pseudoplatystoma fasciatum* (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006), um ducto espermático foi localizado na porção central de cada testículo, estendendo-se até a papila urogenital.

Assim como na maioria dos peixes teleósteos e anfíbios, a espermatogênese de *P. lineatus* ocorre dentro de cistos que são envolvidos por células de Sertoli, enquanto em outras espécies como *Hemigrammus marginatus* (MAGALHÃES et al., 2011), *Scorpaena porcus* e *Scorpaena scrofa* (SÀBAT et al., 2009), a espermatogênese é semi-cística, já que parte do processo ocorre fora de cistos (para revisão ver SCHULZ et al., 2010). No geral, para todos os peixes teleósteos, a espermatogênese tem início quando as espermatogônias primárias associadas com as células de Sertoli se dividem por mitose originando as espermatogônias secundárias, que se diferenciam em espermatócitos primários. Estes iniciam o processo de meiose e, na primeira divisão, originam os espermatócitos secundários que, por sua vez, entram na segunda divisão meiótica e originam as espermátides. Estas células passam por um processo de espermiogênese originando os espermatozoides (MIURA, 1999; NAGAHAMA, 1983; PUDNEY, 1995; SCHULZ et al., 2010).

O compartimento germinativo apresentou túbulos seminíferos contendo cistos com células germinativas em diversos estágios de maturação e em desenvolvimento sincrônico. Células de Sertoli, com núcleo polimórfico, em geral alongado, foram encontradas envolvendo as espermatogônias primárias e os cistos das demais células germinativas através de extensões citoplasmáticas. O citoplasma destas células continha corpos delimitados por membrana, de vários tamanhos e formas, contendo substâncias de diferentes densidades (corpos residuais), sendo consideradas para Koulish, Kramer e Grier (2002) como componentes do sistema endolisossomal. Segundo Schulz et al. (2010), as principais funções

da célula de Sertoli são dar suporte à sobrevivência, ao desenvolvimento e ao funcionamento fisiológico das células germinativas. Entretanto, elas também secretam fluido que gera o lúmen tubular e fagocitam células germinativas apoptóticas, corpos residuais descartados pelas espermatídes durante a espermiogênese e espermatozoides residuais (CINQUETTI; DRAMIS, 2003; PUDNEY, 1995; SCHULZ et al., 2010), uma vez que macrófagos e outros tipos de células fagocíticas, em geral, não estão presentes no compartimento tubular dos testículos. Para Grier (1981), a fagocitose de corpos residuais é uma função típica das células de Sertoli observada em mamíferos e também em teleósteos.

A literatura é escassa de dados morfológicos e morfométricos relacionando as células germinativas durante a evolução do processo de espermatogênese em peixes em geral, e especialmente em *P. lineatus*. Os dados morfológicos e morfométricos das células germinativas obtidos neste trabalho permitiram conhecer melhor a morfologia dos testículos desta espécie e estimar as mudanças celulares, e principalmente nucleares, que ocorrem durante este processo. O processo espermatogênico em *P. lineatus* mostra uma diminuição celular e nuclear das células germinativas, de espermatogônia primária até espermatozoide, como observado em outros teleósteos (LEAL et al., 2009; LO NOSTRO et al., 2003; MATTA et al., 2002; SCHULZ et al., 2005), sendo que a diminuição nuclear, avaliada estatisticamente neste trabalho, mostrou-se significativa. Esta diminuição é resultado de cada divisão e condensação cromossômica que ocorre durante a espermatogênese, resultando em células muito pequenas no final, os espermatozoides.

Schulz et al. (2010) consideraram espermatogônias do tipo A indiferenciadas as células isoladas e as agrupadas (4, 8 ou 16 células) dentro do cisto. Para *P. lineatus*, seguiu-se uma terminologia descrita para peixes de dois tipos de espermatogônias, considerando-se basicamente o tamanho e o número de células dentro dos cistos. Por exemplo, espermatogônias grandes e únicas foram denominadas espermatogônias primárias ou tipo A, já espermatogônias agrupadas (em par ou mais) e pequenas foram referidas como espermatogônias secundárias ou do tipo B (BILLARD, 1986; SELMAN; WALLACE, 1986). Entretanto, para outros autores, as espermatogônias primárias ou do tipo A são consideradas células tronco espermatogênicas em peixes (GRIER, 1981; KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002; NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009; SCHULZ et al., 2010).

A morfologia da espermatogônia primária foi descrita em peixes por vários autores (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006; DOMINGOS et al., 2012; FISHELSON; DELAREA; GON, 2006; KAVAMOTO; NARAHARA; ANDRADE-TALMELLI, 1998; KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002; LO NOSTRO et al., 2003; MIURA, 1999; NAKAGHI

et al., 2003; NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009; PUDNEY, 1995; QUAGIO-GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999; ROMAGOSA et al., 2000) e corroboram com as observações encontradas em *P. lineatus*. As espermatogônias primárias são células isoladas, sendo as maiores células germinativas nos testículos. Na literatura, há uma tendência para associar o tamanho das espécies com o diâmetro da espermatogônia do tipo A (BROWN-PETERSON et al., 2011; PARENTI; GRIER, 2004) e *P. lineatus* confirma este resultado. *A. annularis*, a espermatogônia primária atingia um diâmetro menor quando comparado com espécies maiores (*A. apogonides*, *A. multitaeniatus*, *A. annularis*, *Apogon fraenatus* e *Cheilodipterus lineatus*) (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006) e, nestas últimas, o diâmetro foi similar ao encontrado em *P. lineatus*, uma vez que esta espécie também é de grande porte. Uma similaridade no diâmetro da célula foi encontrada também com duas espécies de peixes ciclídeos (*Tilapia zilli* e *Sarotherodon galilaeus*) (FISHELSON, 2003). Segundo Nagahama (1983), o diâmetro desta célula varia entre espécies diferentes e até mesmo dentro da mesma espécie. Estas células apresentam citoplasma abundante e claro. O núcleo proeminente com um nucléolo evidente e cromatina descondensada mostrou diâmetro similar ao encontrado em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (MATTA et al., 2002; SCHULZ et al., 2005), em *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO et al., 2003) e em *Danio rerio* (LEAL et al., 2009), mas não em *Hemigrammus marginatus* (MAGALHÃES et al., 2011), peixes cardinais (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006) e ciclídeos (FISHELSON, 2003), onde foi menor. Assim, as espermatogônias primárias possuem características nucleares distintas das espermatogônias secundárias.

As espermatogônias secundárias foram caracterizadas pela diminuição no tamanho celular e nuclear comparado com as espermatogônias primárias. Em *P. lineatus*, estas células apresentaram diâmetro similar ao de espécies grandes de peixes cardinais, mas não ao de espécies pequenas (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006) e peixes ciclídeos (FISHELSON, 2003), onde em *P. lineatus* foi praticamente duas vezes maior. Estas células foram encontradas em número variável no interior de cistos envoltos por células de Sertoli. Apresentaram citoplasma escasso e núcleo central, com aumento na densidade da cromatina. Estas características foram também observadas em *Prochilodus argenteus* (DOMINGOS et al., 2012), *Pseudoplatystoma fasciatum* (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006), peixes cardinais (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006) e *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO et al., 2003). O diâmetro nuclear das espermatogônias secundárias de peixes cardinais (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006), *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) e Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (MATTA et al., 2002; SCHULZ et al., 2005) foi similar ao

encontrado em *P. lineatus*, já em *Synbranchus marmoratus*, foi maior comparado com *P. lineatus* e com diâmetro nuclear da espermatogônia primária da própria espécie (LO NOSTRO et al., 2003). Estas células dão origem a espermátócitos após um número fixo de divisões celulares, que é característico de cada espécie, e ficam conectadas por pontes citoplasmáticas devido à citocinese incompleta (ROMAGOSA et al., 2000).

Após a divisão mitótica final, a espermatogônia secundária dá origem aos espermátócitos pré-leptotênicos. Ao término da fase-S, as células germinativas procedem ao longo da prófase (recombinação) da primeira divisão meiótica. A meiose é caracterizada pela separação dos cromossomos de origem paterna e materna que ocorre durante a meta-, ana- e telófase da primeira divisão meiótica que produz os espermátócitos secundários (SCHULZ; MIURA, 2002).

A primeira prófase meiótica é subdividida em estágios que são denominados de acordo com a descrição dos aspectos morfológicos de movimento/condensação dos cromossomos: leptonema, zigonema, paquinema, diplonema e diacinese, e as respectivas células são especificadas como espermátócitos em leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno respectivamente (Schulz et al., 2010). Seguindo esta divisão e as encontradas em outros estudos onde métodos similares aos do presente trabalho foram utilizados (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006; LEAL et al., 2009; SCHULZ et al., 2005), os espermátócitos primários de *P. lineatus* nos diferentes estágios da meiose foram identificados pelas características nucleares. Estas células foram frequentemente encontradas em cortes histológicos devido à longa duração da primeira prófase meiótica. O estágio de pré-leptóteno, apresenta o núcleo em menor tamanho, comparado aos demais tipos de espermátócitos primários, confirmando os estudos com *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) e Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (SCHULZ et al., 2005). Os espermátócitos em leptóteno/zigóteno de *P. lineatus*, são os maiores tipos de células entre os espermátócitos, como encontrado em *Poecilia reticulata* (BILLARD, 1969), mas não em *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) e *Oreochromis niloticus* (SCHULZ et al., 2005). Os espermátócitos em paquíteno têm o núcleo mais denso, e devido à condensação cromossômica, o núcleo diminui em tamanho. Ao contrário foi observado em *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) e *Oreochromis niloticus* (SCHULZ et al., 2005), onde o núcleo neste estágio atingiu seu maior diâmetro. O núcleo dos espermátócitos em diplóteno apresentam os cromossomos com máximo grau de condensação, reduzindo ainda mais o diâmetro, como em *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) e *Oreochromis niloticus* (SCHULZ et al., 2005). Entretanto, em mamíferos, os espermátócitos neste estágio (diplóteno) mostraram o volume máximo (RUSSELL; FRANÇA, 1995). Nós não temos uma

explicação certa para o diâmetro nuclear aumentado em leptóteno/zigóteno em *P. Lineatus*, e zigóteno em *Poecilia reticulata* (BILLARD, 1969), assim, como Leal et al. (2009), não tiveram para paquíteno em *Danio rerio*. A meiose I se inicia depois que a fase S tenha sido completada e os cromossomos parentais tenham sido replicados (COOPER, 2002). Em leptóteno/zigóteno, o núcleo já está com o material genético duplicado, consequentemente, com o diâmetro nuclear aumentado. Mesmo que o material nuclear requerido para as duas próximas divisões meióticas continue sendo acumulado no núcleo em paquíteno e diplóteno, podemos supor que a condensação cromossômica visualizada em paquíteno e diplóteno tenha feito com que o diâmetro nuclear destas células se tornasse menor em relação a leptóteno/zigóteno, quando a cromatina está mais descondensada. Claramente, este aspecto da espermatogênese em teleósteo merece mais estudos.

Os espermatócitos secundários em *P. lineatus* são escassos, provavelmente devido ao tempo de vida curto deles ao passarem rapidamente pela meiose II. Porém, estas células são encontradas junto com figuras metafásicas da metáfase II. Há uma diminuição no tamanho celular e nuclear devido ao aumento da condensação cromossômica. Estas características também foram observadas por Romagosa et al. (2000), Batlouni, Romagosa e Borella, (2006), Leal et al. (2009), Schulz et al. (2005), Schulz et al. (2010) e Lo Nostro et al. (2003). O diâmetro nuclear desta célula foi similar ao encontrado em *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) e *Oreochromis niloticus* (MATTA et al., 2002; SCHULZ et al., 2005), entretanto, em peixes cardinais (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006) e *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO et al., 2003), o diâmetro foi praticamente duas vezes menor.

Seguindo a segunda divisão meiótica dos espermatócitos, inicia uma notável transformação citoplasmática e nuclear, a espermiogênese (GRIER, 1981). Em *P. lineatus*, este processo é marcado por uma redução notável no tamanho celular e nuclear e condensação da cromatina. Propomos, para diferenciar os três tipos de espermátides observados em *P. Lineatus*, conforme foi determinado por Leal et al. (2009), Romagosa et al. (2000) e Schulz et al. (2005), as seguintes nomenclaturas: espermátides iniciais, intermediárias e finais. Esta classificação teve como base o aumento da compactação nuclear e do espaço entre as espermátides. O diâmetro do núcleo nos três tipos de espermátides de *P. lineatus* segue os padrões encontrados em *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) e *Oreochromis niloticus* (MATTA et al., 2002; SCHULZ et al., 2005). Já em *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO et al., 2003), o diâmetro de espermátides iniciais foi quase duas vezes maior do que em *P. lineatus*.

Os eventos da transformação de espermátides a espermatozoides maduros em *P. lineatus* são muito similares aos encontrados em outros peixes teleósteos (MIURA, 1999;

SCHULZ; MIURA, 2002), assim como a estrutura morfológica geral do espermatozoide (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006; ROMAGOSA et al., 2000; SCHULZ et al., 2010) e o diâmetro nuclear (ANDRADE et al., 2001; FISHELSON, 2003; FISHELSON; DELAREA; GON, 2006; LO NOSTRO et al., 2003). O acrossomo está ausente em *P. lineatus*, assim como em outros Characiformes, como, o cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006) e o matrinxã, *Brycon cephalus* (ROMAGOSA et al., 2000) e como na maioria dos teleósteos, mas é encontrado em peixes acipenserides, lampreias e tubarões (MIURA, 1999). Possui um único flagelo como na maioria dos teleósteos e em outros vertebrados, enquanto em algumas espécies de peixes cardinais (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006) e *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO et al., 2003) tem sido encontrado espermatozoide biflagelar. O núcleo redondo e peça intermediária também são comuns na maioria dos teleósteos.

6.2 Determinação da fase e da subfase reprodutiva nos testículos usados nas análises morfométrica e estereológica

Recentemente foi desenvolvido um modelo conceitual para identificar as fases críticas dentro do ciclo reprodutivo com a finalidade de ser utilizado em peixes teleósteos, independente da colocação filogenética, gênero ou estratégia reprodutiva, cujos critérios podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva e temperatura da água. Esta terminologia foi padronizada e proposta por Brown-Peterson et al. (2011). A definição de cada fase está baseada em critérios morfológicos, histológicos e fisiológicos, e não em aspectos temporais no desenvolvimento dos gametas. As cinco fases propostas são Imaturo, Desenvolvimento, Apto para Reprodução, Regressão e Regeneração. A fase Imaturo apresenta somente espermatogônias primárias no compartimento germinativo e não apresenta lúmen nos túbulos; a fase de Desenvolvimento apresenta espermatocistos de espermatogônias, espermatócitos, e espermátides, mas ausência de espermatozoides no lúmen do túbulos ou nos ductos espermáticos, além da presença de epitélio germinativo contínuo (EGC) próximo ao ducto em todo o testículo; a fase Apto para Reprodução, apresenta espermatozoides no lúmen dos túbulos e/ou nos ductos espermáticos, presença de todos os estágios da espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides) em processo ativo, e o epitélio germinativo (EG) pode estar dividido em três tipos: inicial (onde o EG é contínuo em todos os túbulos ao longo dos testículos), médio (onde o EG é contínuo nos espermatocistos na periferia dos túbulos e descontínuo nos túbulos próximos ao ducto) e avançado (onde o EG

é descontínuo em todos os túbulos ao longo dos testículos); a fase de Regressão é caracterizada pela presença de espermatozoides residuais no lúmen dos túbulos e nos ductos espermáticos, apresenta somente cistos de espermátócitos secundários, espermátides e espermatozoides, e é comum encontrar o epitélio germinativo em regeneração na periferia dos testículos; a fase de Regeneração não apresenta espermatozoides, o lúmen dos túbulos é frequentemente inexistente, apresenta epitélio germinativo contínuo por todo o testículo, e quantidades pequenas de espermatozoides residuais podem ocorrer ocasionalmente no lúmen dos túbulos ou dos ductos.

Seguindo-se os critérios acima mencionados, a fase no ciclo reprodutivo de *P. lineatus* foi determinada como Apto para Reprodução e, de acordo com a estrutura do epitélio germinativo, como subfase de Epitélio Germinativo Médio, em todos os animais avaliados. Esta análise foi importante para dar uma classificação reprodutiva aos animais utilizados nas análises morfométrica e estereológica dos testículos. Segundo Brown-Peterson et al. (2011), a terminologia reprodutiva proposta parece ser aplicável a todos os peixes, desde primitivos até os mais evoluídos, e foi recentemente utilizada para descrever o ciclo reprodutivo de uma espécie de elasmobrânquios, *Raja clavata* (SERRA-PEREIRA; FIGUEIREDO; GORDO, 2011), um teleósteo de água doce, *Gasterosteus aculeatus* (BROWN-PETERSON; HEINS, 2009) e vários teleósteos marinhos (BAUMBERGER et al., 2010; BRULÉ et al., 2010).

6.3 Análise estereológica dos componentes testiculares

Investigar estereologicamente a proporção volumétrica (%) do compartimento tubular e intertubular e dos componentes dos compartimentos tubular e intertubular em diferentes regiões dos testículos de *P. lineatus* é um dos primeiros estudos com teleósteos nativos. Entretanto, este tipo de estudo vem sendo realizado em teleósteos avaliando-se, por exemplo, a espermatogênese entre diferentes espécies (COSTA et al., 2010), o efeito do hipotireoidismo (MATTA et al., 2002) e, comparando-se o efeito de diferentes temperaturas nos testículos (ALVARENGA; FRANÇA, 2009).

A proporção volumétrica do compartimento tubular em *P. lineatus* não foi alterada significativamente entre as regiões anterior, média e posterior dos testículos, assim como, a proporção volumétrica dos componentes (espermátogônias primárias e secundárias, espermátócitos primários e secundários, espermátides, espermatozoides, células de Sertoli, lúmen tubular e túnica própria) não variou entre as três regiões. A porcentagem de compartimento intertubular e dos componentes que fazem parte dele (células de Leydig, vasos

sanguíneos e tecido conjuntivo) também não mudaram significativamente entre as três regiões. Os resultados mostraram que na fase reprodutiva Apto para Reprodução, o compartimento tubular ocupou em torno de 89% dos testículos, e as espermatogônias primárias somente 0,6%. Entretanto, em mamíferos, estas células compreendem somente 0,3% de todas as células germinativas (KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002). Já o compartimento intertubular ocupou cerca de 11% do tecido. Observou-se uma predominância de cistos de espermatócitos primários (~ 27,7%) e de espermátides (~ 22,3%) sobre os outros tipos de células germinativas nas três regiões dos testículos, mostrando intensa espermatogênese e espermiogênese nesta fase. Assim, a fase reprodutiva Apto para Reprodução determinada em *P. lineatus* está de acordo com as observações de Brown-Peterson et al. (2011), uma vez que nesta fase reprodutiva o tecido encontrava-se em espermatogênese ativa com todos os tipos de espermatocistos.

As estruturas avaliadas neste estudo estão uniformemente distribuídas ao longo dos testículos (regiões A, M e P) e não em locais específicos. Matta et al. (2002) e Schulz et al. (2005), mostram que a coleta dos fragmentos de testículos, em geral, são retirados de vários segmentos do órgão, provavelmente, devido à falta de conhecimento do padrão de distribuição das estruturas. Nakaghi et al. (2003) fizeram comparações entre amostras de testículos de *Colossoma macropomum* (Characidae) das regiões A, M e P, verificando a área do núcleo das células de Sertoli e do tecido intersticial durante o ciclo reprodutivo, sendo que as análises estatísticas mostraram que nenhuma diferença histológica foi detectada. Romagosa et al. (1993) não observaram nenhuma diferença entre as porções cefálica, média e caudal em preparações histológicas de testículos de *Piaractus mesopotamicus*, revelando que estas regiões são semelhantes em organização estrutural e funcional. Os resultados destes estudos para as espécies de Characiformes, corroboram aos de *P. lineatus* (Characiformes). Portanto, para outras aplicações, qualquer região dos testículos de *P. lineatus* pode ser amostrada sem afetar ou interferir com os resultados do foco de investigação nos testículos. Ainda, os dados apresentados aqui servirão como uma fonte pronta de informação para uma variedade de necessidades relacionadas com os testículos de peixes.

6.4 Análise estereológica e morfométrica da espermatogônia primária

O volume estimado da espermatogônia primária foi $1.252 \mu\text{m}^3$ e o número médio de espermatogônias primárias por testículos foi de aproximadamente 2,4 bilhões ($2,4 \times 10^6$). Nós não temos conhecimento de estudos estereológicos determinando o número de espermatogônias primárias por testículos em teleósteos, mas estudos similares tem sido realizados com outros tipos celulares nos testículos de teleósteos com células de Leydig (MATTA et al., 2002), e de mamíferos com células de Leydig (COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2010; RUSSELL; FRANÇA, 1995), macrófagos, células mióides (RUSSELL; FRANÇA, 1995) e células de Sertoli (COSTA et al., 2008; RUSSELL; FRANÇA, 1995).

Comparado com os estudos de *Oreochromis niloticus* (SCHULZ et al., 2005; VILELA et al., 2003) e *Danio rerio* (LEAL et al., 2009), onde os mesmos métodos foram utilizados, o volume nuclear da espermatogônia primária em *P. lineatus* apresenta um padrão similar ao encontrado em *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) e em *Oreochromis niloticus* (SCHULZ et al., 2005). Entretanto, uma diferença marcante foi encontrada no volume citoplasmático, onde em *P. lineatus* foi o dobro do volume relatado em *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) e, aproximadamente, duas vezes menor que o volume relatado em *Oreochromis niloticus* (SCHULZ et al., 2005). O volume celular em *P. lineatus* é aproximadamente 3 vezes maior do que o volume relatado em mamíferos (RUSSELL; FRANÇA, 1995). A grande diferença no volume citoplasmático da espermatogônia primária entre as espécies citadas indica que esta célula tem características morfológicas específicas que podem ser particulares para cada espécie.

Estimar o número médio de espermatogônias primárias por testículos pode gerar informações importantes para uma variedade de estudos relacionados com esta célula. Recentemente, os métodos utilizados para isolar as espermatogônias primárias tem sido padronizados. Por exemplo, o transplante destas células dos testículos de animal doador para os testículos de um animal receptor gerando espermatozoides maduros com as características genéticas do doador (NÓBREGA et al., 2009; NÓBREGA et al., 2010), com o intuito de obter células germinativas diferenciadas em cultivo, e futuramente produzir espermatozoides *in vitro* (HONG et al., 2004). Estudos como estes oferecem oportunidade para a biotecnologia e fornecem possibilidades importantes para a preservação de estoques genéticos de animais de importância comercial e/ou de espécies ameaçadas de extinção.

O isolamento das espermatogônias primárias é obtido através da dissociação e digestão enzimática dos testículos e posterior fracionamento por gradiente descontínuo de

densidade com Percoll (BELLVÉ et al., 1977; LACERDA et al., 2006; LACERDA et al., 2008). Geralmente a técnica de isolamento permite obter um número muito pequeno de células, tornando inviável a realização de um estudo *in vitro* apropriado. Em peixes, isto geralmente ocorre principalmente porque estes animais apresentam um período de reprodução que, na maioria das vezes, ocorre apenas uma vez no ano. Em *P. lineatus*, uma espécie que apresenta este tipo de reprodução, o período reprodutivo ocorre entre os meses de outubro e janeiro, sendo que os machos desta espécie antecipam a maturação testicular em relação às fêmeas (RAMOS et al., 2010). Assim, no período reprodutivo e o que antecede a ele, o número de espermatogônias primárias nos testículos é baixo, pois os testículos estão em fase de produção e armazenamento de espermatozoides, o que leva ao aumento no número de células germinativas mais diferenciadas. Segundo Panda, Barman e Mohapatra (2011), a maioria dos peixes exibe um ritmo reprodutivo anual e portanto, é muito provável que as características de diferenciação e proliferação das células tronco espermatogoniais sejam época-específica.

Em *P. lineatus*, verificamos que a fase Apto para Reprodução determinada, mostrou o tecido testicular em intensa espermatogênese, com predominância de espermatócitos e espermátides, sendo que o número médio de espermatogônias primárias estimado por testículos foi aproximadamente 2,4 bilhões, equivalente a 0,6% somente. Este valor é resultado do número total de espermatogônias existente nos testículos do tecido fixado. Em um procedimento de isolamento de células, deve ser considerada uma diminuição deste número, devido à perda de células que pode ocorrer tanto durante o procedimento de digestão como no processo de separação com Percoll.

O número médio de espermatogônias primárias por testículos de *Prochilodus lineatus* encontrado neste trabalho foi de aproximadamente $2,4 \times 10^6$. É necessário para o cultivo celular um número ideal de células por poço para se obter uma taxa ótima de proliferação celular. Em uma placa de cultura contendo 24 poço, por exemplo, são necessárias $5,0 \times 10^5$ células por poço para se adquirir uma taxa adequada de crescimento das células (comunicação pessoal, dados não publicados). Tendo em vista estas informações, supomos que seria necessária a utilização de no mínimo dois animais para se obter um número de células adequado para se realizar múltiplas amostras na placa de cultura a fim de utilizá-las em distintas análises e/ou em diversos tempos de coletas. Neste trabalho, nós isolamos e posteriormente, cultivamos as espermatogônias primárias de no mínimo dois *Prochilodus lineatus* por experimento. Ao fim de cada processo de isolamento, foi feita a contagem total das células e dividiram-se as células totais no número adequado citado acima em diferentes

wells. Nossos resultados foram satisfatórios pois, além de conseguirmos um número amostral excelente de células, conseguimos observar com sucesso a proliferação das células durante o tempo de cultivo.

Técnicas de enriquecimento de espermatogônias primárias nos testículos pode garantir um número suficiente de células utilizadas em um estudo de cultivo celular. Alvarenga e França (2009) estudando o peixe teleósteo *Oreochromis niloticus*, mantidos em médias de temperatura da água de 20 °C, observaram que a espermatogônia tipo A ou primária, mostrou um maior índice de proliferação, aumentando também o índice apoptótico de espermatócitos e de espermatídes. Todavia, Vilela et al. (2003), afirmaram que a espécie produz normalmente espermatozoides quando são mantidas em temperaturas acima de 24 °C, acelerando a espermatogênese quando mantidas a 30 °C e parando em paquíteno em 20 °C. Para Alvarenga e França (2009), existe um balanço entre a autorrenovação e a diferenciação espermatogonial em *Oreochromis niloticus* mantidas em temperatura da água de 25 °C; entretanto, quando mantidos a temperatura de 20 °C, a autorrenovação da espermatogônia do tipo A foi induzida, enquanto em temperatura da água superior a 30 °C, a diferenciação das células germinativas foi desencadeada, resultando em produção mais rápida e maior de espermatozoides.

Kubota, Avarbock e Brinster (2003), denominando as espermatogônias com habilidade de se auto-renovar de células tronco espermatogoniais, expôs que o progresso que envolve estudos *in vivo*, bem como, *in vitro* destas células é largamente dificultado devido à concentração nos testículos ser extremamente baixa. Assim, acreditamos que manter animais a 20 °C por um longo período seria interessante, porque eles poderiam ser excelentes doadores de espermatogônias primárias, por causa do aumento da apoptose das células germinativas mais avançadas que regride a espermatogênese e consequentemente, aumenta a autorrenovação e proporção das espermatogônias primárias nos testículos destes animais.

Além disso, a eficiência de técnicas que permitem o isolamento dos componentes testiculares, em especial da espermatogônia primária, apenas pode ser avaliada por meio do conhecimento da composição dos testículos intactos. Segundo Ramos et al. (2010), devido às características específicas das espermatogônias primárias estarem ligadas a determinadas espécies de teleósteos, dados quantitativos podem ser usados para fornecer um entendimento mais completo desta célula.

6.5 Método imuno-histoquímico aplicado aos testículos

Fragmentos de testículos de *P. lineatus* selecionados para a avaliação imuno-histoquímica mostraram-se bem marcados com o fixador Methacarn para todos os anticorpos primários testados. Quando incubados com o anticorpo primário anti-Gfr α 1, observou-se marcação da membrana fraca. O interstício foi encontrado fortemente marcado, assim como, o citoplasma fracamente marcado, sendo estes resultados também observados em tilápias e outras espécies de teleósteos (comunicação pessoal) provavelmente inespecífica. Nos controles negativos dos testículos de *P. lineatus* não observamos marcação contra este anticorpo. Pelo fato de observarmos marcação em relação à amostra controle, consideramos o método aplicável a *P. lineatus*, ou seja, existe especificidade deste anticorpo contra as espermatogônias primárias. Foi observado também imunorreatividade pelo anti- Gfr α 1 em tilápias, *Oreochromis niloticus*, em cortes seriados histológicos, exclusivamente em espermatogônias indiferenciadas. A especificidade deste anticorpo foi confirmada quando se reconheceu a proteína Gfr α 1 em tilápias em análises de *Western blot* (LACERDA et al., 2013). A expressão do Gfr α 1 foi reconhecida também em equídeos, burros e mulas, na espermatogônia indiferenciada, por imuno-histoquímica e *immunoblotting* (COSTA et al., 2012). Já em carpa *Labeo rohita*, não foi observada expressão do Gfr α 1 na população indiferenciada enriquecida de células tronco espermatogonais (PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011).

Observamos que o material incubado com anti-Vasa mostrou marcação contra este anticorpo. Apesar da marcação ter sido fraca, foi mais evidente nas células germinativas mais indiferenciadas, como espermatogônias, diminuindo nas células germinativas mais avançadas. Segundo Nóbrega et al. (2010) e Leal et al. (2009), o Vasa é altamente expresso na espermatogônia indiferenciada mas a expressão diminui durante a meiose e espermiogênese corroborando com os nossos resultados. Assim, consideramos que os resultados obtidos para o anti-Vasa são aplicáveis para *P. lineatus* e consideramos que este anticorpo pode ser usado como marcador de células germinativas para esta espécie.

O material incubado com o anticorpo primário anti-Oct4, não mostrou marcação nas espermatogônias primárias de *P. lineatus*. Portanto, o método utilizado não é aplicável. Embora tenham sido realizadas tentativas com modificações no método utilizado, nenhuma marcação foi detectada nas amostras avaliadas. Sugere-se que o anticorpo utilizado não tenha especificidade para as espermatogônias primárias de *P. lineatus*.

6.6 Obtenção, isolamento e cultivo das espermatogônias primárias

As células germinativas de *P. lineatus* adultos foram fracionadas em gradiente descontínuo de Percoll com a finalidade de se obter uma população celular rica em espermatogônias. Com este procedimento simples e fácil, e que não requer marcações especiais, maior quantidade de espermatogônias tronco fica presente na população de células espermatogoniais selecionadas (KHAIRA et al., 2005).

O gradiente de Percoll reduziu a quantidade inicial de células somáticas e germinativas mais avançadas. Pelo fato das características morfológicas das células-alvo de *P. lineatus* serem muito semelhantes às das espermatogônias primárias, presentes em grande número nas duas camadas superiores da coluna de Percoll pode-se considerar que as mesmas encontravam-se no pool destas células. Embora este resultado não tenha sido quantificado, tendo como base a morfologia celular, ainda se observou a presença de uma população heterogênea no final do processo. Entretanto, consideramos que a utilização deste método foi um passo inicial importante na separação das células germinativas. Lacerda et al. (2006) utilizaram o método de centrifugação com Percoll para selecionar as espermatogônias mais imaturas para transplante. Os resultados do estudo de Lacerda et al. (2006) sugerem que o protocolo foi muito eficiente na separação da população das células germinativas contendo espermatogônias iniciais. Embora também não tenham quantificado os resultados obtidos, poucas células de Sertoli, mióides peritubulares e de Leydig estiveram presentes no pool de células germinativas selecionadas. Os autores avaliaram a viabilidade das células com azul de tripan no final do processo e encontraram uma viabilidade maior do que 96%, corroborando com o nosso resultado, que foi maior do que 90%.

Panda, Barman e Mohapatra (2011) realizaram a separação das espermatogônias tronco pelo método de centrifugação por gradiente de Ficoll, um composto diferente com função similar a do Percoll, de separar as células por gradiente. Esses resultados corroboram aos de *P. lineatus*, pois permitiu separar diferentes bandas celulares, sendo que as duas bandas superiores apresentaram espermatogônias iniciais, e o *pellet* espermatozoides e outras células somáticas e sanguíneas. Embora o método utilizado tenha descontaminado substancialmente a fração a ser utilizada de espermátides, espermatozoides e outras células somáticas, a completa remoção não pôde ser alcançada, o que também corrobora com os nossos resultados. Panda, Barman e Mohapatra (2011) só conseguiram enriquecer o *pool* de células tronco espermatogoniais utilizando o MACS (separação celular ativada por magnético) após a utilização do Ficoll.

Foram realizadas inúmeras tentativas de cultivar as células obtidas nas duas camadas do topo da coluna de Percoll, com meio de cultura rico em nutrientes, mas não se obteve sucesso no cultivo. Observou-se que as espermatogônias primárias não progrediram e desapareciam dentro de poucos dias. Já, as células somáticas, cultivadas em grande número junto com as espermatogônias primárias, desenvolveram-se rapidamente. Segundo Shikina, Ihara e Yoshizaki (2008), as células somáticas em truta arco-íris apresentam um ciclo celular rápido, competem pelos nutrientes do meio de cultura e se proliferaram rapidamente, todavia as espermatogônias primárias apresentam um ciclo celular lento. Os autores sugeriram que o supercrescimento das células somáticas inibe a sobrevivência e proliferação das espermatogônias. Eliminando uma grande proporção das células somáticas em *P. lineatus*, sugere-se que as espermatogônias primárias se expandam no cultivo, pois na presença de soro bovino fetal 10% (SBF) como suplemento no meio de cultivo, as células somáticas se multiplicaram rapidamente, provavelmente impedindo a proliferação e a sobrevivência das espermatogônias. Além disso, o SBF a 10% é extremamente importante para o processo de proliferação e sobrevivência das espermatogônias primárias.

Muitos trabalhos vêm realizando o método do plaqueamento diferencial por adesão para enriquecer o meio de cultivo com espermatogônias primárias, tanto em peixes (LACERDA et al., 2010; LACERDA et al., 2013; SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008; SHIKINA; GORO, 2010), como em humanos (HE et al., 2010). Em peixes, tentaram eliminar as células somáticas e purificar a espermatogônia cultivando as células por 12 – 15 horas (LACERDA et al., 2006; LACERDA et al., 2010; LACERDA et al., 2013) e por 30 – 40 horas (SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008; SHIKINA; YOSHIZAKI, 2010). Em humanos, cultivaram as células por 3 horas, sem alguma pré-separação, para remover a contaminação potencial por células de Sertoli e mióides (HE et al., 2010). Após este período, as células somáticas aderiram fortemente na placa, enquanto as espermatogônias estiveram em suspensão ou fracamente aderidas nas células somáticas ou na placa. Para eliminar as células somáticas e purificar as espermatogônias foi coletada a população celular em suspensão. Após duas ou três coletas, as espermatogônias foram obtidas com uma pureza de 95-99%, contendo poucas células somáticas residuais. A suspensão das espermatogônias tendeu a formar grandes cachos um dia após a purificação (SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008; SHIKINA; YOSHIZAKI, 2010).

Considerando-se estas descobertas, para os testículos de *P. lineatus* foi realizado no presente trabalho, o plaqueamento diferencial por adesão, para enriquecer o meio com as células desejáveis, as espermatogônias primárias, após a pré-separação com Percoll.

Conforme já mencionado, o protocolo utilizado no presente trabalho para selecionar espermatogônias por meio de plaqueamento diferencial por adesão foram adaptações a partir das metodologias preconizadas na literatura (LACERDA et al., 2012; SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008) para outras espécies. Os resultados obtidos a partir deste protocolo sugerem que o mesmo foi eficiente para enriquecer o meio de cultivo com espermatogônias. Além de aumentar o número, a taxa de sobrevivência e a proliferação destas células também foram melhoradas. Após cultivar as células por 14 – 17 horas e coletar as células livres, nossos resultados foram satisfatórios, pois conseguimos eliminar uma grande proporção de células somáticas e enriquecer o meio com espermatogônias. Embora uma quantidade substancial de células somáticas ainda tenha ficado na suspensão celular e tenha sido cultivada junto com as espermatogônias, observou-se que a presença destas células, na quantidade alcançada após o plaqueamento diferencial por adesão, foi importante para o cultivo das espermatogônias. Assim, sem a realização do plaqueamento diferencial, consideramos que a quantidade de células somáticas, que é exuberante nos testículos, dificultaria o progresso das espermatogônias durante o cultivo, em *Prochilodus lineatus*. É importante ressaltar que ainda não existe nenhum tipo de marcador molecular específico para espermatogônias-tronco em peixes, e principalmente em *P. lineatus*. Essa característica de aderência das células somáticas testiculares à placa de cultivo foi também discutida em tilápias (LACERDA et al., 2012; SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008) corroborando com *P. lineatus*.

Nossos resultados mostraram claramente que a centrifugação do gradiente descontínuo de Percoll seguido pelo plaqueamento diferencial por adesão não só retirou espermátocitos, espermátides, espermatozoides, hemácias e outras células somáticas, mas também enriqueceu o pool de espermatogônias primárias da população celular testicular heterogênea digerida enzimaticamente.

Outro método de isolamento e enriquecimento das espermatogônias primárias realizado para *P. lineatus* foi o *Cell sorting*, por citometria de fluxo, das células germinativas, separando e enriquecendo as espermatogônias primárias para eliminar as células somáticas em grande proporção e células germinativas mais avançadas da suspensão celular. Este método, poderia posteriormente substituir o método de separação das células germinativas com o gradiente de Percoll seguido do plaqueamento diferencial por adesão. Apesar de fácil e barato, os últimos métodos requerem um grande gasto de tempo de trabalho. Foram utilizadas para a padronização desta metodologia células obtidas da digestão enzimática dos testículos e células obtidas da centrifugação com Percoll para se comparar o rendimento da separação

celular entre as duas amostras. Devido à falta de um marcador específico para espermatogônias primárias (tronco) de peixes, foram utilizados como critério de separação nesta etapa o tamanho e a granularidade celular, critérios também utilizados por Kise et al. (2012). Já é conhecido que as espermatogônias primárias apresentam o citoplasma hialino e sem granulações, sendo estas células as maiores células germinativas dos testículos de *P. lineatus*. Porém, as células somáticas são células capazes de realizar fagocitose, portanto, possuem muitos grânulos como fagossomos no citoplasma. Os resultados obtidos com este método foram satisfatórios para *P. lineatus*, pois foi possível separar diferentes populações a partir do tamanho e da granularidade, sem algum marcador.

Analisando-se a morfologia das diferentes populações celulares separadas, constatou-se que na população onde se estimava encontrar as espermatogônias primárias (P4) havia muitas células com características morfológicas semelhantes a estas, como células grandes, contendo citoplasma claro, e núcleo com cromatina descondensada e com um nucléolo evidente, na amostra com e sem Percoll. Nas amostras oriundas da digestão enzimática dos testículos (sem Percoll), observamos na P4, além da presença de muitas espermatogônias primárias, a presença de muitas hemácias, e até o momento não temos informação na literatura se estas células, vistas em grande proporção, atrapalham o cultivo das espermatogônias. Já, analisando o rendimento da separação celular entre as duas amostras, observou-se que a amostra oriunda do Percoll apresentou uma pureza de somente 28,1%. Na amostra que não foi submetida ao Percoll, observou-se uma pureza de 61,8%. Da amostra que não foi submetida ao Percoll, quando se restringiu o *gate*, obteve-se uma pureza de 74,5%. Nós não restringimos o *gate* na amostra oriunda do Percoll, pois todas as células foram requeridas para uma única análise. Temos a intenção, posteriormente, de restringir o *gate* da P4 com Percoll, assim como realizado na amostra sem Percoll, para que se possa analisar melhor os resultados do rendimento entre as duas amostras, e assim obter uma conclusão mais acertiva.

Neste trabalho não foram utilizadas células separadas pelo *Cell sorting* no cultivo, pelo motivo da técnica de separação necessitar de um grande número de células, já que aproximadamente 50% das células são perdidas durante o procedimento. A quantidade das células adquiridas na separação foi necessária para a análise da morfologia em um primeiro momento. Seria de grande valia, futuramente, testar o progresso das células separadas, *in vitro*, especialmente, no que diz respeito à presença de células somáticas, visto que, aparentemente a contaminação por estas células na população P4 separada pela citometria de

fluxo foi pequena, e já se observou neste trabalho que a presença das células de Sertoli parece ser importante no progresso das espermatogônias em cultivo em *P. lineatus*.

Em nosso estudo, observou-se que as espermatogônias primárias frequentemente estavam fracamente aderidas nas células somáticas durante todo o tempo de cultivo, e isto nos faz sugerir duas razões: primeiro, estas células parecem não apresentar a capacidade de se aderir naturalmente na placa de cultura tratada com gelatina, precisando de um substrato específico, no caso, as células de Sertoli; segundo, se estas células não apresentam a capacidade de adesão e estavam frequentemente aderidas às células somáticas, isto é sugestivo de que as células somáticas desempenham alguma função importante e são requeridas pelas espermatogônias em cultivo. *In vivo*, sabe-se que as células de Sertoli são importantes nos testículos para dar suporte à sobrevivência, ao desenvolvimento e ao funcionamento fisiológico das células germinativas (SCHULZ et al., 2010), além da fagocitose (CINQUETTI; DRAMIS 2003; PUDNEY, 1995; SCHULZ et al. 2010). *In vitro*, provavelmente algumas destas condições, ou todas, também sejam requeridas das células de Sertoli.

Nossos resultados mostraram claramente que durante o decorrer do cultivo houve intensa proliferação das espermatogônias, que formaram grandes aglomerados celulares no tempo maior do cultivo que foram frequentemente observados fracamente aderidos às células de Sertoli. Kawasaki et al. (2012), avaliando a propagação das células tronco espermatogoniais de zebrafish, *Danio rerio*, em cultura por 30 dias, mostraram que estas células espermatogoniais se submeteram à autorrenovação e diferenciação em espermatozoides, logo, as espermatogônias cresceram e formaram aglomerados sobre a camada de células somáticas. Os autores mostraram que as células somáticas testiculares trabalham efetivamente como uma camada alimentadora (*feeder layer*) para a cultura de células tronco espermatogoniais, e sugerem que estes resultados podem ser aplicáveis a outros vertebrados, como anfíbios. Sakai (2002), analisando a diferenciação das células germinativas em cultura de zebrafish, *Danio rerio*, mostrou que as células somáticas são importantes no cultivo, ajudando não só na adesão de espermatogônias e espermatócitos, como também mantendo estas células no cultivo. O autor observou que a maioria das células germinativas aderiu-se às células somáticas após as células somáticas se aderirem à placa tratada com gelatina, sugerindo que as células somáticas foram requeridas para a cultura de células germinativas. Huleihel, Abuelhija e Lunenfeld (2007), relataram que entre os produtos das células de Sertoli, estão as proteínas transportadoras e de ligação, proteínas funcionais e de matriz, proteases e inibidores de proteases, fatores de crescimento e substratos de energia,

como o lactato. Além disso, o processo de espermatogênese está sob a regulação de ambos os tipos celulares - células de Sertoli e células germinativas (por interação física e secreção de fatores biológicos). Assim, os fatores parácrinos/autócrinos são importantes no crescimento e/ou na diferenciação de culturas de células tronco espermatogoniais.

Neste trabalho, observamos que as células somáticas, especificamente as de Sertoli, apresentaram vários tipos morfológicos em cultura, desde arredondadas até um aspecto espreado semelhante a fibroblasto, tornando-se cada vez mais espreada com decorrer da cultura, além de apresentarem muitos grânulos citoplasmáticos lucentes. Estas descobertas corroboram com os resultados de Sakai (2002), que observou que as células somáticas apresentaram formato de células semelhantes a fibroblastos e células epiteliais, em cultura com células germinativas, características estas descritas também por Lacerda et al. (2013), em cultura com espermatogônias. Para caracterizar as células somáticas, a atividade fagocítica foi analisada pela absorção de esferas de látex, sendo que muitas das células mostraram atividade fagocítica (SAKAI, 2002).

Em *P. lineatus*, as células foram cultivadas em dois tipos diferentes de meio de cultura, ou seja, o meio basal foi suplementado de duas maneiras diferentes. No primeiro meio, sugestivo para a indução da proliferação celular, diversos autores (LACERDA et al., 2013; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011; SHIKINA; IHARA; YOSHIKAWA, 2008; SHIKINA; YOSHIKAWA, 2010) cultivaram as espermatogônias primárias de peixes e observaram ativa proliferação das espermatogônias primárias durante o tempo de cultivo. O segundo meio foi sugestivo para induzir a diferenciação celular. Hong et al. (2004) e Sasaki et al. (2005), utilizaram este meio no cultivo de espermatogônias tronco (HONG et al., 2004) e de espermatócitos primários (SASAKI et al., 2005), observando em seus resultados que ambos os tipos celulares foram capazes de diferenciação *in vitro*, formando espermatozoides móveis e férteis.

Neste estudo, as amostras contendo meio de cultura sugestivo para proliferação celular e que não tiveram o meio trocado, em 15 dias de cultivo, aparentemente apresentaram maior número de células e proliferação celular mais intensa comparado com as amostras que tiveram a metade do meio trocado a cada 3 dias. Pode-se sugerir que a retirada do meio de cultura diminuiu o número de células, dificultando a proliferação. Em um estudo realizado por Panda, Barman e Mohapatra (2011), foi observado que a troca do meio de cultura semanalmente possivelmente dificultou a aderência celular das espermatogônias primárias, atrasando a taxa de proliferação, o que poderia ter sido diferente se o intervalo de

passagem/troca do meio tivesse sido mantido por mais do que duas semanas, quando a cultura poderia ter se tornado mais estável.

A análise do progresso *in vitro* das espermatogônias primárias de *P. lineatus* durante 15 dias nos revelou resultados importantes. A partir de 48 horas de cultivo, se observou o aparecimento de pequenos aglomerados celulares, sugestivos de espermatogônias primárias, indicando que estas células estavam em processo ativo de proliferação. Com o decorrer do cultivo, estes aglomerados celulares não só aumentaram em tamanho como em número, e em 15 dias de cultivo, surgiram aglomerados grandes com características de colônias, frequentemente presos frouxamente às células de Sertoli. Da mesma forma, Kawasaki et al. (2012), mostraram que em 30 dias de cultura as células espermatogoniais se proliferaram constantemente em forma de aglomerados e, após este período, os aglomerados espermatogoniais aumentaram, aderidos às células somáticas. Os autores ainda em um estudo de imunofluorescência mostraram que estes aglomerados eram positivos ao BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina), confirmando a presença de proliferação celular.

Segundo Panda, Barman e Mohapatra (2011), as espermatogônias tronco proliferaram em cultura, lentamente, por cerca de três semanas e, em seguida, se expandiram em aglomerados. Os aglomerados aumentaram ainda mais, formando colônias. As colônias estiveram fracamente aderidas à superfície da placa de cultura. Estas características foram claramente constatadas em *P. lineatus*, em 15 dias de cultivo. Lacerda et al. (2013) observaram que em 3 dias de cultivo as espermatogônias de *O. niloticus* formaram aglomerados e, em 7 dias, estas células proliferaram ativamente, evidenciado pela confluência celular formada e pela incorporação do BrdU. Em 26 dias de cultivo, as espermatogônias formaram grandes colônias que se mantiveram até 30 dias. Shikina, Ihara e Yoshizaki (2008) verificaram que as espermatogônias, ainda em suspensão, tiveram a tendência de formar aglomerados 1 dia após ter sido realizado o plaqueamento diferencial por adesão, e Shikina et al. (2013) observaram que as espermatogônias cultivadas por 5 dias formaram grandes aglomerados. Sakai (2002) avaliou a indução da espermatogênese *in vitro* pela adição de 11-cetotestosterona, a partir de células germinativas dissociadas enzimaticamente. O autor constatou que as células germinativas formaram aglomerados e dividiram por mitose. O aglomerado tornou-se maior até o aparecimento de espermatozoides flagelados, e assim o aglomerado diminuiu em tamanho. Sakai (2002) ressaltou que, devido à similaridade de cada estágio das espermatogônias em observações microscópicas e a falta de marcadores específicos para estas células, foi difícil identificar o estágio de início de proliferação das células germinativas, o que para nós, neste trabalho, também ocorreu. Cabe salientar também

que o meio de cultura sugestivo para proliferação celular utilizado para *P. lineatus* com pequenas modificações de outros autores (LACERDA et al., 2013; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011; SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008; SHIKINA et al., 2013), rico em nutrientes, foi propício e eficaz para desencadear a proliferação das espermatogônias primárias.

O método de imunofluorescência realizado com as células cultivadas caracterizou as células-alvo de *P. lineatus*, cujo alvo eram as espermatogônias primárias. Com o uso de um marcador de células germinativas, o anti-Vasa, e mais precisamente, o uso de marcadores de células tronco espermatogoniais e de células tronco pluripotentes e germinativas primordiais, o anti-GFR α 1 e o anti-OCT4, respectivamente, pudemos verificar marcações positivas destes anticorpos nos aglomerados celulares presentes durante o cultivo, caracterizando as espermatogônias primárias. Embora estes marcadores não sejam originados de peixes, atualmente eles tem sido utilizados em diversos trabalhos com peixes (LACERDA et al., 2013; NÓBREGA et al., 2010; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011), camundongo (MORIMOTO et al., 2009), eqüídeos (COSTA et al., 2012) com resultados satisfatórios, caracterizando as espermatogônias primárias. Lacerda et al. (2013) observaram em 3 dias de cultivo que as espermatogônias formaram grandes aglomerados, e estes foram positivos ao Vasa e ao OCT4 por imunocitoquímica. Em 26 dias de cultivo as espermatogônias que formaram grandes colônias expressaram Vasa e GFR α 1 no padrão de expressão gênica avaliado por *RT-PCR*.

No presente trabalho, as células cultivadas foram tratadas com BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina), um composto sintético análogo da timidina, incorporado nas células em divisão na fase S do ciclo celular. Posteriormente, foram submetidas ao método de imunofluorescência utilizando o anticorpo primário anti-BrdU, com o objetivo de se confirmar a proliferação celular em cultura. Os resultados deste método não confirmaram a proliferação das células de *P. lineatus*. Para verificar a proliferação celular foram realizados estudos qualitativos durante a cultura, e pôde-se observar claramente a presença e o aumento em tamanho e em número dos aglomerados celulares, indicando ativa proliferação das células. Portanto, esses resultados foram comparados com outros estudos de cultura de espermatogônias em peixes (KAWASAKI et al., 2012; LACERDA et al., 2013; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011; SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008; SHIKINA et al., 2013), que corroboram com os deste estudo.

Provavelmente a aplicação do BrdU somente uma vez no dia 0 (zero), conforme foi realizado por Sasaki et al. (2005), não permitiu a estabilidade do componente nas células a cada divisão após ser incorporado na fase S do ciclo celular. Seria interessante testar a aplicação em vários pulsos durante o cultivo, e em momentos antes da coleta das células. Outra questão importante está relacionada a concentração do BrdU. Utilizamos no cultivo a concentração de 0,5 μ M. Segundo Sasaki et al. (2005), que utilizou o composto na cultura de células germinativas de medaka, *Oryzias latipes*, esta concentração foi preparada para não afetar a espermatogênese, sendo mínima para detectar a marcação por imunocitoquímica no espermatozoide formado na cultura celular, uma vez que neste peixe a alta concentração de BrdU afetou a espermatogênese na cultura celular. Em *P. lineatus*, concentrações mais altas de BrdU que não comprometam as células espermatogoniais deverão ser testadas no futuro.

Além disso, a diferenciação celular durante o período de cultivo também não pôde ser avaliada em *P. lineatus*, pois as supostas células mais diferenciadas e eventuais espermatozoides formados durante o cultivo não foram identificados pelo método de imunofluorescência com o anticorpo anti-BrdU. Será válida a tentativa de aplicar o BrdU em pulsos, pois as células diferenciadas poderão ser marcadas com o anti-BrdU, caso o processo ocorra durante o cultivo a partir das espermatogônias primárias que incorporaram este composto. Tendo em vista estes resultados, não podemos afirmar que o meio de cultura sugestivo para a diferenciação espermatogonial utilizado neste trabalho desencadeou o processo.

Em *P. lineatus*, utilizando o meio de cultura sugestivo de diferenciação celular, foi notado que as espermatogônias primárias proliferaram mais lentamente e em menor proporção, pois raramente encontramos aglomerados celulares semelhantes aos encontrados nas culturas que receberam o meio sugestivo para proliferação. Uma diferença marcante entre as duas culturas foi a presença, a partir de 4 dias de cultivo, de grandes massas celulares com características únicas de compacidade no centro, envolvidas por muitas células de Sertoli e células germinativas, que aumentaram em número e em tamanho em 13 dias de cultivo, e se mantiveram até o 15º dia de cultivo. Estas estruturas foram citadas por Panda, Barman e Mohapatra (2011), que relataram a presença, na cultura, de colônias de espermatogônias primárias compactas no centro, após estas proliferarem ativamente. Lacerda et al. (2013) também mostraram em suas micrografias estruturas semelhantes a estas. Os últimos autores mostraram que estas colônias foram positivas ao anti-Vasa e ao anti-GFR α 1, marcadores de células germinativas e de espermatogônias-tronco, respectivamente. Em nossas análises de

imunofluorescência, ocorreu marcação positiva ao anti-Vasa, anti- GFR α 1 e ao anti-OCT4 nas células cultivadas com o meio sugestivo para diferenciação celular, mas não foi possível identificar se as células marcadas encontravam-se dispostas em colônias, apesar de, aparentemente, mostrarem uma tendência para se dispor desta forma.

Aparentemente, não houve, na cultura com meio sugestivo para diferenciação celular, com a amostra que recebeu o extrato embrionário de *P. lineatus*, e com a amostra que não recebeu o extrato, alguma diferença. Ambas as culturas apresentaram os mesmos tipos celulares com as mesmas características. Foi demonstrado que o extrato embrionário de truta arco-íris promoveu a mitose de espermatogônia purificada (SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008), assim como o extrato embrionário do peixe medaka têm fatores essenciais para o cultivo de espermatogônia (HONG et al., 2004), pois contêm fatores que afetam a mitose espermatogonial (SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008). Ainda não se sabe com precisão quais moléculas deste componente estão envolvidas na mitose espermatogonial, o que seria muito interessante determinar em estudos futuros.

Cabe salientar que a padronização da cultura de espermatogônias primárias de *P. lineatus* requereu um grande número de métodos associados à separação celular, à caracterização das espermatogônias primárias, e ao estabelecimento da cultura primária destas células. São ainda necessárias muitas tentativas para elucidar os processos que envolvem a manutenção, a proliferação e a diferenciação das espermatogônias primárias de *P. lineatus in vitro*.

Sendo assim, acreditamos que os resultados morfológico, morfométrico, estereológico e do cultivo da espermatogônia primária contribuiu para melhor compreensão da biologia reprodutiva de *P. lineatus*, e o conhecimento obtido aqui pode ser utilizado para ser comparado com os dados obtidos de outros Characiformes. Sabe-se que a espécie tem considerável potencial econômico, portanto o conhecimento sobre a estereologia dos componentes testiculares, número médio de espermatogônias primárias por testículos e cultivo destas células, pode ser aplicado em metodologias como a cultura de células-tronco espermatogoniais e o transplante destas, criando oportunidade para o desenvolvimento biotecnológico e preservação dos recursos genéticos de animais comercialmente importantes e / ou de espécies ameaçadas de extinção, uma vez que vários autores estão tentando caracterizar as células “tronco” espermatogoniais de peixes com espécies que não são sulamericanas, como a tilápia, *Oreochromis niloticus* (LACERDA et al., 2012), zebrafish, *Danio rerio* (SAKAI, 2002) e medaka, *Oryzias latipes* (HONG et al., 2004), sendo que, desta

forma, poderemos ter um representante dos Characiformes, grupo este de grande importância econômica e ecológica na América do Sul.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, concluiu-se que:

- ✓ Os testículos de *P. lineatus* seguiram os padrões da maioria dos teleósteos quanto à distribuição, morfologia e composição dos compartimentos tubular e intertubular;
- ✓ Houve diminuição celular e nuclear das células germinativas, de espermatogônia primária até espermatozoide, durante o processo espermatogênico em *P. lineatus*, sendo que a diminuição nuclear, avaliada estatisticamente, mostrou-se significativa;
- ✓ A fase do ciclo reprodutivo de *P. lineatus* utilizada nas análises morfométrica e estereológica foi determinada como "Apto para Reprodução" e, de acordo com a estrutura do epitélio germinativo, como subfase de Epitélio Germinativo Médio, em todos os machos avaliados;
- ✓ Não houve diferença significativa na proporção volumétrica do compartimento tubular em *P. lineatus* entre as regiões anterior, média e posterior dos testículos, assim como, na proporção volumétrica dos componentes (espermatogônias primárias e secundárias, espermatócitos primários e secundários, espermátides, espermatozoides, células de Sertoli, lúmen tubular e túnica própria);
- ✓ Não houve diferença significativa na proporção volumétrica do compartimento intertubular e dos componentes que fazem parte dele (células de Leydig, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo) entre as regiões anterior, média e posterior dos testículos;
- ✓ No processo de isolamento das espermatogônias primárias, o uso do gradiente de Percoll é recomendado, pois reduziu a quantidade inicial de células somáticas e células germinativas mais avançadas, apesar de ainda restar uma população bastante heterogênea no final do processo;
- ✓ Também no plaqueamento diferencial por adesão, realizado após a pré-separação com Percoll, obtivemos aumento no número de espermatogônias primárias, na taxa de sobrevivência e na proliferação destas células, reforçando a recomendação da sua utilização;
- ✓ Foi possível separar parcialmente diferentes populações celulares, em especial, as espermatogônias primárias, a partir do tamanho e da granularidade, sem algum marcador, pelo método de isolamento e enriquecimento das espermatogônias primárias realizado pelo *Cell sorting*, por citometria de fluxo das células germinativas, oriundas do processo de separação com e sem Percoll;

- ✓ Foi possível obter intensa proliferação das espermatogônias em grandes aglomerados celulares no final do cultivo, frequentemente aderidos fracamente às células de Sertoli;
- ✓ As amostras contendo meio de cultura sugestivo para proliferação celular e que não tiveram o meio trocado, em 15 dias, de cultivo apresentaram maior número de células e proliferação celular mais intensa comparado com as amostras que tiveram a metade do meio trocado a cada 3 dias;
- ✓ Aparentemente, não houve diferença, na cultura com meio sugestivo para diferenciação celular, entre a amostra que recebeu o extrato embrionário de *P. lineatus*, e a amostra que não recebeu o extrato;
- ✓ Foi possível caracterizar as células cultivadas como espermatogônias primárias pelo método de imunofluorescência, com o uso do anti-Vasa, anti-GFR α 1 e anti-OCT4;

REFERÊNCIAS*

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; JÚLIO, H. J. Migratory fish from the upper Paraná River Basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. World Fisheries Trust. Victoria: The World Bank and the International Development Research Centre, 2003. p. 19–99.
- AGUILLEIRO, B.; GARCIA-HERNÁNDEZ, M. P.; GARCÍA-AYALA, A. Teleost adenohypophysis: morphofunctional and developmental aspects. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPPOR, B. G. **Fish Endocrinology**. Enfield: Science Publishers, 2006. v. 1, p. 287–323.
- ALEXANDRINO, A. C.; PHAN, M. T.; PINHEIRO, E. F. G. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, durante o ciclo reprodutivo. **Boletim de Zoologia**, v.9, p. 159–175, 1985.
- ALVARENGA, É. R.; FRANÇA, L. R. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 537–544, 2009.
- ANDRADE, R. F.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). **Tissue & Cell**, v. 33, p. 524–532, 2001.
- 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.
- BAUMBERGER, R. E.; BROWN-PETERSON, N. J.; REED, J. K.; GILMORE, R. G. Spawning aggregation of beardfish, *Polymixia lowei*, in a deep-water sinkhole off the Florida Keys. **Copeia**, v. 1. p. 41–46, 2010.
- BELLVÉ, A. R.; CAVICCHIA, J. C.; MILLETTE, C. F.; O'BRIEN, D. A.; BHATNAGAR, Y. M.; DYM, M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. **Journal of Cell Biology**, v. 74, n. 1, p. 68–85, 1977.
- BILLARD R. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. **Annual Biology animal Biochemistry and Biophysical**, v. 9, n. 3, p. 307–313.
- BILLARD R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species (1). **Reproduction Nutrition Development**, v. 26, p. 877–920, 1986.
- BLÀZQUEZ, M.; BOSMA, P. T.; FRASER, E. J.; VAN LOOK, K. J. W.; TRUDEAU, V. L. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. **Comparative Biochemistry and Physiology (C)**, v. 119, p. 345–364, 1998.

-

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

BRAAT, A. K.; SPEKSNIJDER, J. E.; ZIVKOVIC, D. Germ line development in fishes. **International Journal of Developmental Biology**, v. 43, p. 745–760, 1999.

BRINSTER, R. L.; AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 11303–11307, 1994.

BROWN-PETERSON, N. J.; HEINS, D. C. Interspawning interval of wild female three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* in Alaska. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 2299–2312, 2009.

BROWN-PETERSON, N.J.; WYANSKI, D.M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B.J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, v. 3, p. 52–70, 2011.

BRULÉ, T.; COLÁS-MARRUFO, T.; PÉREZ-DÍAZ, E.; SÁMANO-ZAPATA, J. C. Red snapper reproductive biology in the Southern Gulf of Mexico. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 139, p. 957–968, 2010.

CAIRES, K.; BROADY, J.; MCLEAN, D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. **Journal of Endocrinology**, v. 205, p.133–145, 2010.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 361–366, 2007.

CAUTY, C.; LOIR, M. The interstitial cells of the trout testis (*Oncorhynchus mykiss*): ultrastructural characterization and changes throughout the reproductive cycle. **Tissue & Cell**, v. 27, p. 383–395, 1995.

CINQUETTI R.; DRAMIS, L. Histological, histochemical, enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* between annual breeding seasons. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 1402–1428, 2003.

COOPER GM. **A célula: uma abordagem molecular**. Porto Alegre: Artmed Editora; 2002. 712 p.

COSTA, G. M. J.; CHIARINI-GARCIA, H.; MORATO, R. G.; ALVARENGA, R. L. L. S.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 70, p. 1136–1146, 2008.

COSTA, G. M. J.; LEAL, M. C.; FERREIRA, A. C. S.; GUIMARÃES, D. A.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in 2 large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). **Journal of Andrology**, v. 31, p. 489–499, 2010.

COSTA, G. M. J.; AVELAR, G. F.; REZENDE-NETO, J. V.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; LACERDA, S. M. S. N.; ANDRADE, B. S. C.; THOMÉ, R. G.; HOFMANN, M. C.; FRANÇA, L. R. Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. **PLOS ONE**, v. 7, Issue 8, p. 1–13, 2012.

EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. **The physiology of fishes**. New York: CRC Press, 2006. 601 p.

DE ROOIJ, D.G.; OKABE, M.; NISHIMUNE, Y. Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, SL17H/SL17H, and cryptorchid mice. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 842–847, 1999.

DOMINGOS, F. F. T.; THOMÉ, R. G.; ARANTES, F. P.; CASTRO, A. C. S.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in an area of influence of a tributary, downstream from a hydroelectric power dam, Brazil. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 1709–1719, 2012.

FANTA, E. Influence of the background color on the behaviour of the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 4, p. 1237–1251, 1995.

FAO – Fisheries Department. **State of world aquaculture**. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations. 145p.<http://www.fao.org>. Acesso em: 31 out. 2006.

FISHELSON L. Comparison of testes structure, spermatogenesis, and spermatocytogenesis in young, aging, and hybrid ciclid fish (Ciclidae, Teleostei). **Journal of Morphology**, v. 256, p. 285–300, 2003.

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.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 351–360, 2007.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**: subordem Characoidei, bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba: Franciscana, 1975. v. 1–2.

GONÇALVES, A. C. S.; NASCIMENTO, A. F.; COSTA, A. C.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Animal Reproduction**, v.10, n.1, p. 62–70, 2013.

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

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: **The Sertoli cell**. RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. Clearwater: Cache River Press, 1993. p. 703–739.

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. **Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, v. 53, p. 537–552, 2002.

HAYASHI, M.; SATO, M.; NAGASAKA, Y.; SADAIE, S.; KOBAYASHI, S.; YOSHIZAKI, G. Enrichment of Spermatogonial Stem Cells Using Side Population in Teleost. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 23, p.1–8, 2014.

HE, Z.; KOKKINAKI, M.; JIANG, J.; DOBRINSKI, I.; DYM, M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 363–372, 2010.

HONG, Y.; SCHARTL, M. Isolation and differentiation of medaka embryonic stem cells. In: Turksen, K. (Ed.), **Embryonic Stem Cell Protocols**. Methods in Molecular Biology. New Jersey: Humana Press Inc, 1996. p. 5–16.

HONG, Y.; LIU, T.; ZHAO, H.; XU, H.; WANG, W.; LIU, R.; CHEN, T.; DENG, J.; GUI, J. Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 8011–8016, 2004.

KHAIRA, H.; MCLEAN, D.; OHL, D. A.; SMITH, G. D. Spermatogonial Stem Cell Isolation, Andrology Lab Corner* Storage, and Transplantation. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, p. 442–450, 2005.

HULEIHEL, M.; ABUELHIJA, M.; LUNENFELD, E. *In vitro* culture of testicular germ cells: Regulatory factors and limitations. **Growth Factors**, v. 25, n. 4, p. 236–252, 2007.

KANATSU-SHINOHARA, M.; INOUE, K.; LEE, J.; YOSHIMOTO, M.; OGONUKI, N.; MIKI, H.; BABA, S.; KATO, T.; KAZUKI, Y.; TOYOKUNI, S.; TOYOSHIMA, M.; Niwa, O.; Oshimura, M.; HEIKE, T.; NAKAHATA, T.; ISHINO, F.; OGURA, A.; SHINOHARA, T. Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis. **Cell**, v. 119, p. 1001–1012, 2004.

KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Mudanças morfológicas dos testículos de curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner) (Teleostei, Prochilodontidae), submetido à indução hormonal. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, p. 109–115, 1998.

KAWASAKI, T.; SAITO, K.; SAKAI, C.; SHINYA, M.; SAKAI, N. Production of zebrafish offspring from cultured spermatogonial stem cells. **Genes to Cells**, v. 17, p. 316–325, 2012.

KISE, K.; YOSHIKAWA, H.; SATO, M.; TASHIRO, M.; YAZAWA, R.; NAGASAKA, Y.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Flow-Cytometric Isolation and Enrichment of Teleost Type A Spermatogonia Based on Light-Scattering Properties. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 4, p. 1–12, 2012.

KOULISH, S.; KRAMER, C.R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, v.254, p. 292–311, 2002.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. **PNAS**, v. 100 n. 11, p. 6487–6492, 2003.

LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; SILVA, S. B. G.; HOMEM, C. S. P.; FRANÇA, L. R. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. **Animal Reproduction**, v.3, n.2, p. 146–159, 2006.

LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; ASSIS, L. H.; RESENDE, F. M.; CAMPOS-SILVA, S. M.; CAMPOS-SILVA, R.; SEGATELLI, T. M.; FRANÇA, L. R. Germ cell transplantation in tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Cybium**, v. 32, p. 115–118, 2008.

LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; COSTA, G. M. J.; SEGATELLI, T. M.; QUIRINO, B. R.; QUEIROZ, B. M.; KALAPOTHAKIS, E.; FRANÇA, L. R. A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) **Model**, v. 5, Issue 5, p. 1–9, 2010.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y.; MORITA, T.; YOSHIZAKI, G.; FRANÇA, L. R. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n.1, p. 3–11, 2012.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; PEIXOTO, M. T. D.; RESENDE, R. R.; FRANÇA, L. R. Phenotypic characterization and *in vitro* propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 1, n. 192, p. 95–106, 2013.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; FRANÇA, L. R. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. **General and Comparative Endocrinology**, DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.06.018, 2014.

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**, v. 81, n. 1, p. 177–187, 2009.

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

LO NOSTRO, F. L.; ANTONELI, F. N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GUERRERO, G. A. Testicular interstitial cells, and steroidogenic detection in the protogynous fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). **Tissue & Cell**, v. 36, p. 221–231, 2004 .

LUCAS, M. C.; BARAS, E. 2001. Migration of freshwater fishes. Blackwell Science. 420p. In: MELO, F. C. S. A.; GODINHO, H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 380–385, 2006.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1. ed. Brasília: MMA; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. 1420 p.

MAGALHÃES, A. L. B.; ANDRADE, R. F.; GOMES, B. V. C.; PERINI, V. R.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Ultrastructure of the semicystic spermatogenesis in the South American freshwater characid *Hemigrammus marginatus* (Teleostei, Characiformes). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, p. 1041–1046, 2011.

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. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 970–978, 2002.

MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 5774–5778, 1991.

MIURA T. Spermatogenic cycle in fish. In: Knobil & Neill JD (eds.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999. v. 4, p. 571– 578.

MORIMOTO, H.; KANATSU-SHINOHARA, M.; TAKASHIMA, S.; CHUMA, S.; NAKATSUJI, N.; TAKEHASHI, M.; SHINOHARA, T. Phenotypic Plasticity of Mouse Spermatogonial Stem Cells. **PLoS ONE**. v. 4, Issue 11, 1-9, 2009.

MOYLE, P. B.; CECH, J. J. **Fishes. An introduction to ichthyology**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2003. 590p.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983, p. 223–264.

NAKAGHI, L. S. O.; MITSUIKI, D.; SANTOS, H. S. L.; PACHECO, M. R.; GANECO, L. N. Morphometry and morphology of nucleus of the sertoli and interstitial cells of the tambaqui *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1881) (Pisces: Characidae) during the reproductive cycle. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 97–104, 2003.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4. ed. New York: Wiley – Interscience, 2006. 624p.

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.

NÓBREGA, R. H.; CAAj, C. D.; KANT, H. V.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1–16, 2010.

PANDA, R. P; BARMAN, H. K.; MOHAPATRA C. Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from *Labeo rohita* testis for *in vitro* propagation. **Theriogenology**, v. 15, p. 241–251, 2011.

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

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, v. 6, p. 459–497, 1995.

PURCHTLER, H.; WALDROP, F. S.; MELOAN, S. N.; TERRY, M. S.; CONNER, H. M. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. **Histochemie**, v. 21, p. 97–116, 1970.

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

QUINTERO-HUNTER, I; GRIER, H.; MUSCATO, M. Enhancement of Histological Detail Using Metanil Yellow as Couterstain in Periodic Acid Schiff's Hematoxylin Staining of Glycol Methacrylate Tissue Sections. **Biotechnic & Histochemistry**, v.66, p. 169–172, 1999.

RAMOS, R. O.; PERET, A. C.; RAMOS, S. M.; MELO, J. S. C. Parâmetros reprodutivos do curimatá no rio Mogi-Guaçu. **Revista Ceres**, v. 57, p. 520–525, 2010.

RESENDE, E. K.; CATELLA, A. C.; NASCIMENTO, F. L.; PALMEIRA, S. S.; PEREIRA, R. A. C.; LIMA, M. S.; ALMEIDA, V. L. L. **Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP; 1996. Boletim de Pesquisa.

ROCHA, M. J.; ROCHA, E. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes – An overview. p. 570–624. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPPOR, B. G. **Fish Endocrinology**. Enfield: Science Publishers, v. 2, 2006. 871p.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; TALMELLI, E. F. A.; BRAGA, M. S. Mudanças morfológicas dos testículos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. **Revista UNIMAR**, v. 15, p. 1–17, 1993.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; AYROZA, L. M. S.; BORELLA, M. I.; FENERICH-VERANI, N. Reproductive cycle of male matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 17, p. 101–105, 2000.

RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue & Cell**, v. 27, p. 129–147, 1995.

SÀBAT, M.; LO NOSTRO, F.; CASADEVALL, M.; MUÑOZ, M. A light and electron microscopic study on the organization of the testis and the semicystic spermatogenesis of the Genus *Scorpaena* (Teleostei, Scorpaenidae). **Journal of Morphology**, v. 270, p. 662–672, 2009.

SAKAI, N. Transmeiotic differentiation of zebrafish germ cells into functional sperm in culture. **Development**, v. 129, p. 3359–3365, 2002.

SANTOS, E. **Peixes de água doce**. Rio de Janeiro: F. Briguiet & CIA, 1962. 272 p.

SASAKI, T.; WATANABE, A.; TAKAYAMA-WATANABE, E.; SUZUKI, M.; ABE, H.; ONITAKE, K. Ordered progress of spermiogenesis to the fertilizable sperm of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in cell culture. **Development Growth Differentiation**, v. 47, n. 2, p. 87–97, 2005.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 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. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 891–898, 2005.

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

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

SERRA-PEREIRA, B.; FIGUEIREDO, I.; GORDO, L. S. Maturation of the gonads and reproductive tracts of the thornback ray *Raja clavata*, with comments on the development of a standardized reproductive terminology for oviparous elasmobranchs. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, v. 3, p. 160–175, 2011 .

SHIKINA, S.; IHARA, S.; YOSHIZAKI, G. Culture Conditions for Maintaining the Survival and Mitotic Activity of Rainbow Trout Transplantable Type A Spermatogonia. **Molecular Reproduction And Development**, v. 75, p. 529–537, 2008.

SHIKINA, S.; YOSHIZAKI, G. Improved *In Vitro* Culture Conditions to Enhance the Survival, Mitotic Activity, and Transplantability of Rainbow Trout Type A Spermatogonia. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 268–276, 2010.

SHIKINA, S.; NAGASAWA, K.; HAYASHI, M.; FURUYA, M.; IWASAKI, Y.; YOSHIZAKI, G. Short-Term *In Vitro* Culturing Improves Transplantability of Type A Spermatogonia in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Molecular Reproduction & Development**, v. 80, p. 763–773, 2013.

TAKEI, Y.; LORETZ, C. A. Endocrinology. In: EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. **The Physiology of Fish**. 3 ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p. 271–318.

TOLKUNOVAA, E. N.; MALASHICHEVAA, A. B.; CHIKHIRZHINAA, E. V.; KOSTYLEVAA, E. I.; ZENG, W.; LUOC, J.; DOBRINSKIC, I.; HIERHOLZERB, A.; KEMLERB, R.; TOMILIN, A. N. E-Cadherin as a Novel Surface Marker of Spermatogonial Stem Cells. **Cell and Tissue Biology**, v. 3, n. 2, p. 103–109, 2009.

TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 6, p. 287–318, 1996.

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

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

VIVEIROS, A. T. M.; TAFFAREL, T. R.; LEAL, M. C. Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm. **Neotropical Ichthyology**, DOI: 10.1590/1982-0224-20130207, 2014.

WESTERFIELD, M. The Zebrafish Book. **A Guide for the Laboratory Use of 896 Zebrafish (*Danio rerio*)**. 3 ed. [s. L.]: Eugene, OR, 1995. [1 v.]

WOOTON, R. J. **Fish and fisheries series 1: ecology of teleost fishes**. New York: Chapman and Hall, 1990. 404 p.

ANEXOS

ANEXO I: PREPARO DE SOLUÇÕES

LÍQUIDO DE BOUIN

Reagentes para 1000 mL de solução

Ácido pícrico saturado	750 mL
Formol	250 mL
Ácido Acético Glacial	50 mL

Preparo:

Misturar e obter solução homogênea na hora do uso.

FIXADOR METHACARN (PUCHTLER et al., 1970)

Reagentes para 100 mL de solução

Metanol	60 mL
Clorofórmio	30 mL
Ácido acético glacial	10 mL

Preparo:

Misturar e obter solução homogênea na hora do uso. Pode-se manter em geladeira por algumas horas. Recomendável não estocar.

GLUTARALDEÍDO 4% EM TAMPÃO FOSFATO 4% 0,05M

Tampão fosfato 4% 0,05 M pH 7,2 – 7,4

Reagentes para 600 mL de solução

Solução A

Fosfato de sódio monobásico (monohidratado)	0,8 g
Água destilada	120 mL

Solução B

Fosfato de sódio dibásico (anidro)	3,6 g
Água destilada	500 mL

Preparo:

Misturar 114 mL da Solução A + 486 mL da Solução B e obter solução homogênea na hora do uso. Medir o pH: 7,2 – 7,4.

Glutaraldeído 4%

Reagentes para 100 mL de solução

Glutaraldeído 50%	08 mL
Tampão fosfato 4% 0,05 M	92 mL

Preparo:

Misturar e obter solução homogênea na hora do uso. Pode-se manter em geladeira por algumas horas. Recomendável não estocar.

TETRÓXIDO DE ÓSMIO A 2%

Sacarose	5,28 g
Água destilada	50 mL

Preparo:

Misturar e obter solução homogênea na hora do uso. Quebrar uma ampola de OsO_4 de 1 g e acrescentar na solução. Deixar no agitador magnético até diluir totalmente. Pode-se dividir a solução e congelar em frascos protegidos da luz.

PREPARO DA RESINA SPURR (Electron Microscopy Science)

Reagentes para 40 mL de solução

VCR	10 g
DER	4,5 g
NSA	26 g
DMAE	0,4 g

Preparo:

Misturar todos os produtos do Kit/Spurr e colocar no agitador magnético por 30 minutos (lentamente para não formar bolhas e com o becker lacrado para não entrar ar) e obter solução homogênea. Colocar a resina em um vidro protegido da luz e dentro de outro frasco com sílica dentro do freezer.

PREPARO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PERCOLL (Vitrocell-Embriolife)

Preparo da Solução de Percoll 100% (Solução Isotônica)

9 mL de percoll + 1 mL do diluidor de Percoll (Vitrocell-Embriolife)

* Misturar e obter solução homogênea.

Preparo da solução de Percoll 40% = 0,6 mL da solução SI + 0,9 mL de D-MEM-BSA 0,75%

Preparo da solução de Percoll 30% = 0,4 mL da solução SI + 1,1 mL de D-MEM-BSA 0,75%

Preparo da solução de Percoll 20% = 0,2 mL da solução SI + 1,3 mL de D-MEM-BSA 0,75%

Preparo da solução de Percoll 10% = 0,1 mL da solução SI + 1,4 mL de D-MEM-BSA 0,75%.

* Misturar solução SI + D-MEM-BSA 0,75% de cada concentração e obter solução homogênea individualmente.

CORANTE P.A.S.+HEMATOXILINA FÉRRICA+METANIL YELLOW

Solução de Hematoxilina Férrica de Weigert

Solução A:

*Hematoxilina.....1 g

*Álcool 96%.....100 mL

*Maturar no mínimo por cerca de um mês a luz do dia.

Solução B:

*Nitrato férrico (sol. aq. 30%).....1,2g dissolvidos em 4 ml de água destilada

*Água destilada.....95 mL

*Ácido Clorídrico concentrado.....1 mL

*Preparar apenas o que será usado na hora. Não estocar.

Obs.: A solução B da Hematoxilina pode tanto ser usada com Nitrato ou com Cloreto (a quantidade é a mesma), desde que seja padronizado sempre para as lâminas, ou seja, se começar a corar com Cloreto, usar sempre o cloreto. O resultado será o mesmo.

Solução corante:

*50% de solução A

*50% de solução B

Misturar solução A e B e obter solução homogênea.

Solução de Metanil YellowSolução A:

*Metanil yellow.....0,1 g

*Água destilada.....100 mL

Solução B:

*Ácido Acético Glacial.....0,5 mL

*Água destilada.....100 mL

Solução Corante:

*Solução A.....10 mL

*Solução B.....25 mL

*Água destilada.....15 mL

Preparo: misturar e obter solução homogênea.Solução de Reativo de Schiff

Reagentes para 200 mL de solução

Fuccina básica.....5 g

Água destilada.....200 mL

Ácido clorídrico.....3 mL

Metabissulfito de sódio.....9 g

Preparo: dissolver a fuccina básica em água destilada e ferver por 5 minutos. No momento da fervura abaixar o fogo, esperar 5 minutos e desligar (isso é para não deixar derramar quando estiver fervendo em fogo alto).

Retirar do fogo e acrescentar 9 g de metabissulfito de sódio.

Agitar no magnético por 1 hora e 30 minutos.

Deixar 2 horas em repouso.

Filtrar e colocar 3 mL de ácido clorídrico.

Armazenar em frasco escuro, ambiente escuro por 24 horas para descoloração da solução em cor palha.

Acrescentar para cada 100 mL, 0.25 g de carvão ativado. Agitar e deixar descansando por 1 hora até decantar.

Filtrar e no mesmo vidro armazenar na geladeira para uso.

ANEXO II: PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE TESTÍCULOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ (M.L.) E IMUNO-HISTOQUÍMICA

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE TESTÍCULOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ (M.L.) E IMUNO-HISTOQUÍMICA - MÉTODO EM PARAFINA

a. Fixação em Líquido de Bouin (M.O.) 24 horas

Lavagem em água corrente *overnight*

Armazenar em álcool a 70% até o processamento

b. Fixação em Methacarn (Imuno-histoquímica) 3 horas a temperatura de 4° C.

Armazenar em álcool a 70% até o processamento

c. Desidratação:

→ Álcool a 95% 1 hora

→ Álcool a 100% 1 hora

→ Álcool a 100% 1 hora

d. Diafanização

Xilol I 1 hora

Xilol II 1 hora

e. Impregnação na estufa a 60° C com:

Parafina (1° banho) 1 hora

Parafina (2° banho) 1 hora

Parafina (3° banho) 1 hora

f. Emblocagem:

Emblocagem em moldes cúbicos de papel com Parafina solidificado a temperatura ambiente.

g. Microtomia:

Trimagem dos blocos em forma de pirâmide para serem seccionados em 3 micrômetros em Micrótomo *Leica* RM 2155.

h. Lâminas:

Montagem de lâminas, com os cortes obtidos na microtomia, através da aderência com Polilisina, sendo os cortes esticados em banho-maria e secos em estufa a 37 °C antes de serem corados.

i. Coloração

Técnica de rotina para Hematoxilina/Eosina

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE TESTÍCULOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ - MÉTODO EM HISTORESINA (GLICOL METACRILATO)

a. Fixação em Glutaraldeído 4% em Tampão fosfato 4% 0,05 M (1º banho).....2 horas a temperatura de 4 °C.

b. Fixação em Glutaraldeído 4% em Tampão fosfato 4% 0,05 M (2º banho)24 horas a temperatura de 4 °C.

c. Desidratação:

→ Álcool a 70%.....1 hora

→ Álcool a 95%.....2 horas

→ Álcool a 100% (1º banho)1 hora

d. Infiltração:

→ Álcool a 100% + Resina (Glicol metacrilato) (1:1)1 hora

→ Resinaovernigh

e. Inclusão (polimerização):

→ Resina + endurecedor

Inclusão em pocinhos de forminhas retangulares de plástico com Resina + endurecedor solidificado a temperatura ambiente.

f. Colagem

Colocar nas forminhas após a solidificação do material cola (JET, Acrílico Auto Polimerizante: Resina acrílica + líquido acrílico) utilizado em Odontologia Clássica e em seguida suportes plásticos para colar com o bloco de resina. Deixar secando por 24 horas e desenformar. Colocar em vidro com sílica na estufa a 37 °C para não pegar umidade.

Seccionar os blocos em 2 micrômetros em Micrótomo *Leica* RM 2155 utilizando-se navalha descartável de vidro.

g. Lâminas:

Montagem de lâminas, com os cortes obtidos na microtomia, sendo os cortes esticados em água destilada à temperatura ambiente e secos em estufa a 37 °C antes de serem corados.

h. Coloração

P.A.S. + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow.

ANEXO III: PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO DOS CORTES DE TECIDOS

PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO DOS CORTES DE TECIDOS COM HEMATOXILINA/EOSINA

Desparafinização

Xilol I	4 minutos
Xilol II	4 minutos
Álcool a 100%	4 minutos
Álcool a 96%	4 minutos
Álcool a 70%	4 minutos
Lavar com água corrente	3 minutos
Corar com Hematoxilina de Harris.....	3 minutos
Lavar com água corrente	4 minutos
Corar com Eosina	2 minutos

Desidratação

Álcool a 96%	3 minutos
Álcool a 100%	3 minutos
Álcool a 100% + Xilol (1:1).....	3 minutos
Xilol (diafanizador)	3 minutos
Xilol (montagem)	3 minutos

Montar as lâminas com goma de Damar e lamínula.

PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO DOS CORTES DE TECIDOS COM P.A.S. + HEMATOXILINA FÉRRICA + METANIL *YELLOW* EM GLICOL METACRILATO

Desidratar os corte na estufa overnight para a resina aderir na lâmina.

Hidratar novamente em água destilada.

Ácido Periódico 1%10 minutos

Lavar em 3 trocas de água destilada.

Reativo de Schiff.....1 hora

Lavar em água corrente 10 minutos

Hematoxilina férrica 6 minutos

Lavar em água corrente 10 minutos

Metanil Yellow 2 minutos

Tirar o excesso com água corrente.

Agitar bem lâmina por lâmina como se fosse um termômetro para abaixar a temperatura.

Desidratar em estufa a 60° C.....*overnight*

Xilol 30 segundos

Montar as lâminas em goma de Damar e lamínula.

ANEXO IV: PROCESSAMENTO ULTRAESTRUTURAL DAS AMOSTRAS DE TESTÍCULOS - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (M.E.T.)

- a. Fixar em Glutaraldeído 4% em Tampão fosfato 4% 0,05 M (1º banho).....2 horas**
a temperatura de 4 °C.
- b. Fixar em Glutaraldeído 4% em Tampão fosfato 4% 0,05 M (2º banho).....24 horas**
a temperatura de 4 °C.
- c. Armazenar em tampão fosfato 4% à 0,05 M a temperatura de 4 °C até serem processados.**
- d. Lavar em tampão fosfato 4% 0,05 M, pH 7,2 – 7,4.**
- e. Pós-fixação com Tetróxido de Ósmio 2% com sacarose2 horas**
- f. Lavar em água destilada três vezes de 3 minutos**
- h. Contrastação em bloco: com Uranilaovernight**
- i. Desidratação: Álcool 70% três vezes de 10 minutos**
Álcool 95%três vezes de 10 minutos
Álcool 100%quatro vezes de 10 minutos
- j. Lavar em Óxido de propilenoduas vezes de 10 minutos**
- l. Colocar em resina Spurr + Óxido de propileno (1:1) e deixar no agitador à temperatura ambiente, overnight.**
- m. Colocar em resina Spurr e deixar no agitador durante 5 horas à temperatura ambiente.**
- n. Incluir com resina em formas de silicone e deixar na estufa a 60 °C por 3 ou mais dias até a completa polimerização.**
- o. Cortar em Ultramicrótomo.**
- p. Coletar os cortes ultrafinos em tela de cobre.**

ANEXO V: PROTOCOLO DE SUPLEMENTAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADO NA OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DAS ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS

- DMEM/F-12
- SOLUÇÃO SALINA – HBSS (HANKS)
- PBS

SUPLEMENTOS PARA 50 ML DE MEIO DE CULTURA

Penicilina/Estreptomicina (AB).....	500 µL
Gentamicina	50 µL
Anfotericina	125 µL

SUPLEMENTOS PARA 10 ML DE MEIO DE CULTURA

Penicilina/Estreptomicina (AB)	100 µL
Gentamicina	10 µL
Anfotericina	20 µL

ANEXO VI: PREPARO DO SORO DE *Prochilodus lineatus*

O soro de *P. lineatus* foi preparado a partir da extração do sangue para ser utilizado como suplemento no cultivo das espermatogônias primárias. Utilizou-se o soro de peixe por este ser mitogênico, ou seja, promoveu a mitose das células embrionárias de medaka. Têm sido utilizado com sucesso o soro de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, carpa comum, *Cyprinus carpio* e seabass, *Lates calcarifer*.

Foi lavada uma seringa de 5 mL com solução anticoagulante (Hepamax-S®, heparina sódica, 5.000 U.I./mL) e mantida no gelo. Os machos adultos foram anestesiados com dose sub-letal de 0,1 mg/mL de Benzocaína e, rapidamente, foi colhido o sangue retirado da veia caudal, em tubos Falcon, de 50 mL, no gelo. Posteriormente, foi dado um “spin” saungúneo a 4 °C por 30 minutos a 3200 g (RCF). O sobrenadante claro foi transferido em tubos Falcon de 50 mL. Em seguida, incubou-se o soro overnight a 4 °C. Um novo “spin” foi realizado posteriormente, para retirar restos de hemácias do soro. Esterilizou-se o soro por filtração através de filtro de 0.22 µm (Millipore) e este foi estocado em alíquotas de 1mL a -20 °C. Rapidamente antes de usar o soro como suplemento no meio de cultura, foi dado um “spin” a 3200 g (RCF) por 30 minutos e adicionado o sobrenadante ao meio.

ANEXO VII: Preparo do Extrato Embrionário de *Prochilodus lineatus*

Para o preparo o extrato embrionário de *P. lineatus*, foram utilizadas aproximadamente 7.600 larvas com sete dias pós-fertilização que foram doadas pelo Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Jaboticabal/SP e pela Companhia Energética de São Paulo (Usina Hidrelétrica de Paraibuna-SP).

Essas larvas foram mantidas em aquário de 50 litros contendo água previamente aerada com auxílio de um compressor de ar e, mantidas as médias de temperatura da água de 26 °C, controlada por termostato, por um período de 24 horas até completar a idade de sete dias.

As larvas foram coletadas com ajuda de filtros de papel e lavadas em PBS. Em seguida foram transferidas em tubos de 1,5 mL, o PBS foi removido ao máximo, e estocadas a -20 °C até o início do processamento. Em seguida, as larvas foram descongeladas e unidas em tubo Falcon de 50 mL. Mediu-se o volume e estimou-se o número de larvas: 400 larvas/mL, totalizando 7.600 larvas.

Dando sequência ao processamento, o PBS foi removido tanto quanto possível e, realizou-se a homogeneização das larvas com um homogeneizador de laboratório em banho de água gelada, até observar uma massa homogênea. Posteriormente, foi realizado o congelamento/descongelamento três vezes alternativamente em nitrogênio líquido (-196 °C) e, em banho-maria a 37 °C, por 5 minutos cada. Foi dado um “spin” a 4 °C por 30 minutos a 3200 g (RCF). Foi possível a visualização de três fases: a camada lipídica superior, o sobrenadante verde do meio e o fundo preto com debrís. Foi pipetado o sobrenadante verde em ependorfes. Em seguida, deu-se um “spin” a 4 °C por 60 minutos a 15.000 g (RCF). O sobrenadante foi coletado e esterilizado por meio de um filtro de 0.22 µm (Millipore). Adicionou-se PBS para ajustar o volume para 2.5 µL/larva, retiradas alíquotas de 1 mL em ependorfes e estocados o soro a -20 °C.