# FABIANO GONÇALVES COSTA

# TESTÍCULO DE Astyanax altiparanae GARUTTI E BRITSKI, 2000. ESTUDO MORFOLÓGICO, ULTRAESTRUTURAL E IMUNO-HISTOQUÍMICO

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

São Paulo 2011

# FABIANO GONÇALVES COSTA

TESTÍCULO DE Astyanax altiparanae GARUTTI E BRITSKI, 2000. ESTUDO MORFOLÓGICO, ULTRAESTRUTURAL E IMUNO-HISTOQUÍMICO

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

> Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

Versão Original

São Paulo 2011

#### 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

Costa, Fabiano Gonçalves.

Testículo de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000: estudo morfológico, ultraestrutural e imuno-histoquímico / Fabiano Gonçalves Costa. -- São Paulo, 2011.

Orientador: 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: Biologia da reprodução de peixes.

Versão do título para o inglês: Testis of *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000: ultrastructural and immunohistochemical study.

Descritores: 1. Biologia 2. Histologia 3. Morfologia animal 4. Testículo 5. Peixes de água doce 6. Gônadas animal I. Borella, Maria Inês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB086/2011

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

( )	Aprovado(a)	() Reprovado(a)
A Comissão Julgadora pública realiza	dos trabalhos de Defe da a///	sa da Tese de Doutorado, em sessão /, considerou
Orientador(a):	Maria Inês Borella.	
Título da Tese:	Testículo de <i>Astyana</i> estudo morfológico, u	x <i>altiparanae</i> Garutti e Britski, 2000: ıltraestrutural e imuno-histoquímico.
Candidato(a):	Fabiano Gonçalves C	Sosta.

Examinador(a):	Assinatura:
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. Lineu 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

# **C**ERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 90 nas fls. 47 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Maria Inês Borella Coordenador(a) da Linha de pesquisa "Efeito do agrotóxico Thiodan sobre a morfologia do testículo de lambari Astyanax altiparanae (Characidae)" do qual participou(aram) o(s) alunos Fabiano Gonçalves Costa, Mateus Adolfi, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em 31.08.2007.

São Paulo, 18 de setembro de 2007.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima Coordenador CEEA - ICB/USP

Patricia Cartelucci

Profa. Dra. PATRICIA CASTELUCCI Secretária CEEA – ICB/USP

#### AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço imensamente à minha orientadora Profa. Dra. Maria Inês Borella que, durante esses anos todos de trabalho em conjunto, se mostrou uma pessoa generosa e me ensinou muito mais que importantes valores científicos. Apesar de todas as minhas limitações de liberação ela aceitou me orientar e a partir desse momento, comecei a aprender importantes valores científicos e culturais, culminando inclusive em melhorias de minhas práticas pedagógicas. Lembrarei sempre de sua generosidade.

Quero destacar a importância de meus familiares durante essa jornada. À minha esposa Priscila Caroza Frasson Costa agradeço pelo amor, companheirismo, estímulo e compreensão. Aos meus pais, Claudionor e Marli, e aos meus irmãos, Claudmar e Luís Gustavo, agradeço à possibilidade de tantos anos de estudos. Sei que a caminhada para eles foi árdua e por isso merecem local de destaque nesses agradecimentos, como uma humilde forma de reconhecimento.

Aos meus sogros, Valter e Cleusa, e às minhas cunhadas, Deborah e Ana Gabriela, agradeço pelo apoio e incentivo. Agradeço também pela compreensão da ausência em importantes datas de comemoração familiar.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Quando cheguei nessa Instituição para cursar o mestrado no ano de 2000, era jovem demais para compreender sua importância. Hoje, compreendo melhor suas reais dimensões e me orgulho muito de ter sido pós-graduando desta Instituição.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia de Peixes, Mateus, Chayrra, Lázaro, Gisele, Sara e Cruz Alberto (Junior), gostaria de agradecer pelo excelente convívio. Tais amigos fizeram com que essa caminhada fosse mais leve e ainda mais prazerosa. Obrigado a todos vocês.

À Profa. Dra. Celia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade da Universidade Estadual de Londrina agradeço pelo amplo acesso que tive ao Laboratório de Microscopia e Microanálise da UEL. A ela também agradeço pela minha introdução no mundo científico ocorrido na segunda metade dos anos 90.

Em especial agradeço às amigas Luciane Candeloro, Cleusa Maria Pelegrini Raspantini, Ana Lucia T. Mota e Fernanda Barrence que sempre me incentivaram nessa jornada.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Centro de Ciências Biológicas da UENP pelo apoio e estímulo que recebi durante esta jornada. Aos meus alunos da UENP-CLM agradeço pelo incentivo e pela compreensão nos momentos de ausência.

Estendo esses agradecimentos à Reitoria da UENP pela liberação parcial concedida e a CAPES pela concessão da bolsa.

#### RESUMO

Costa FG. Testículo de Astyanax altiparanae GARUTTI e BRITSKI, 2000. Estudo morfológico, ultraestrutural e imuno-histoquímico [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

O teleósteo de água doce Astyanax altiparanae (Characiformes, Characidae), popularmente conhecido como lambari, é um peixe amplamente encontrado em rios brasileiros. Esta espécie possui grande importância econômica e ecológica. Poucos são os trabalhos que visam demonstrar a morfologia dos testículos de peixes sulamericanos. Com isso, a principal ênfase deste estudo foi classificar e demonstrar, através de microscopias de luz e eletrônica, as alterações morfológicas do testículo de Astyanax altiparanae ao longo do ciclo gonadal, bem como quantificar tais alterações. Além disso, utilizando métodos imuno-histoquímicos, foi analisada a distribuição de receptor de andrógeno, de elementos do citoesqueleto e de componentes da matriz extracelular. Como resultado das análises morfológicas, foi observado que o testículo de lambari apresenta regiões secretoras e regiões espermatogênicas. Foram encontrados cinco estádios do ciclo gonadal: regredido, maturação inicial, maturação média, maturação final e regressão. O estudo ultraestrutural, dentre outros aspectos, revelou que as células secretoras que revestem os ductos possuem grande quantidade de organelas relacionadas à síntese de macromoléculas e gotículas de lipídio. O estudo imuno-histoguímico revelou que as principais células que apresentam positividade à detecção de receptor de andrógeno são as células mióides peritubulares e as espermatogônias. Tanto as células secretoras quanto as células de Sertoli apresentam citoqueratina e actina na constituição de seu citoesqueleto. A disposição das fibrilas de colágeno do tipo I foi alterada em distintos estádios do ciclo gonadal. Também foi demonstrada a presença de laminina na membrana basal do epitélio germinativo, além da presença de fibronectina no tecido intersticial deste órgão e no interior de alguns cistos. Este trabalho demonstrou que, de forma surpreendente, os machos de Astyanax altiparanae possuem a capacidade de desenvolver o intersexo, tendo sido revelada a presença de oócitos no interior dos testículos de alguns indivíduos.

Palavras-Chave: Peixes. Testículo. Receptor de Andrógeno. Citoesqueleto. Matriz Extracelular.

## ABSTRACT

Costa FG. Testis of *Astyanax altiparanae* GARUTTI e BRITSKI, 2000. Ultrastructural and immunohistochemical study [Ph. D. thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

The freshwater teleost Astyanax altiparanae (Characiformes, Characidae), popularly known as lambari, is a South American fish commonly distributed throughout Brazilian rivers. This neotropical species has great ecologic and economic importance. Morphological studies on testis of South American teleost species are not frequently found in the appropriated literature. Thus, the main emphasis of this study was to show, using light and electron microscopy techniques, the changes in the morphology of the testis of Astyanax altiparanae which occurred throughout the gonadal cycle. Moreover, using immunohistochemical methods, the distribution of the androgen receptor, cytoskeleton and extracellular matrix components were analyzed. Morphological analysis showed that the testis of A. altiparanae contains spermatogenic and secretory regions. Five stages of the gonadal cycle were found: regressed, early maturation, mid maturation, late maturation and regression. Ultrastructural study, among other aspects, reveals that secretory cells showed a great amount of organelles responsible for macromolecules synthesis, and lipids droplets. The immunohistochemical study reveal that the main cells that were positive for detection of androgen receptor were the peritubular myoid cells and spermatogonia. Actin and cytokeratin were found in the cytoskeleton of Sertoli cells and secretory cells. This work showed that the type I collagen fibers changed in different stages of the gonadal cycle. The presence of laminin in the basement membrane of the germinative epithelium, and the presence of fibronectin in the interstitial tissue of this organ, as well as in some cysts was observed. This work detected that males of Astyanax altiparanae were able to develop the intersex, once oocytes were found in the testis of some individuals.

Keywords: Fish. Testis. Androgen Receptor. Cytoskeleton. Extracellular Matrix.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fotografia de um exemplar de A. altiparanae macho	19
Figura 2.	Fotografia de um testículo de A. altiparanae	38
Figura 3.	Corte histológico da região caudal do testículo de <i>A. altiparanae</i> , corado com HE, onde podem ser visualizadas as células colunares (setas) que possuem atividade secretora	40
Figura 4.	Corte histológico do testículo de <i>A. altiparanae.</i> Porção espermatogênica e secretora	40
Figura 5.	Corte histológico do testículo de <i>A. altiparanae</i> . Epitélio secretor com células de diferentes formas	40
Figura 6.	Corte histológico do testículo de A. altiparanae. Secreção apócrina	40
Figura 7.	Corte histológico do testículo de A. altiparanae. Células cúbicas	40
Figura 8.	Corte histológico do testículo de <i>A. altiparanae.</i> Células pavimentosas	40
Figura 9.	Corte histológico do testículo de <i>A. altiparanae.</i> Presença de espermatogônia entre células secretoras	40
Figura 10.	Corte de testículo de A. altiparanae em maturação inicial	42
Figura 11.	Corte de testículo de A. altiparanae em maturação média	42
Figura 12.	Corte de testículo de A. altiparanae em maturação final	42
Figura 13.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> em regressão	42
Figura 14.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> em regredido	42
Figura 15.	Média do número de pontos obtidos da análise de trinta figuras de testículos de <i>A. altiparanae</i> em cada um dos estádios do ciclo gonadal	43
Figura 16.	Média do número de pontos da análise de nove figuras de testículo de <i>A. altiparanae</i> , sendo três da região caudal, três da região média e três da região cefálica do testículo de um único animal	48
Figura 17.	Média do número de pontos da análise de nove figuras de testículo de <i>A. altiparanae</i> , sendo três da região caudal, três da região média e três da região cefálica do testículo de um único animal	49

Figura 18.	Média do número de pontos da análise de nove figuras de testículo de <i>A. altiparanae</i> , sendo três da região caudal, três da região média e três da região cefálica do testículo de um único animal	49
Figura 19.	Média do número de pontos da análise morfométrica de seis figuras de testículo de <i>A. altiparanae</i> , sendo três da região dorsal e três da região ventral do testículo de um único animal	50
Figura 20.	Média do número de pontos da análise morfométrica de nove figuras de testículo de <i>A. altiparanae</i> , sendo três da região caudal, três da região média e três da região cefálica do testículo de um único animal.	50
Figura 21.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	52
Figura 22.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	52
Figura 23.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	52
Figura 24.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	52
Figura 25.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	52
Figura 26.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	52
Figura 27.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	52
Figura 28.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	52
Figura 29.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	54
Figura 30.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	54
Figura 31.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	54
Figura 32.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	54
Figura 33.	Eletronmicrografia de transmissão do testículo de A. altiparanae	54

Figura 34.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão	54
Figura 35.	Eletronmicrografia de varredura de testículo de A. altiparanae	56
Figura 36.	Eletronmicrografia de varredura de testículo de A. altiparanae	56
Figura 37.	Eletronmicrografia de varredura de testículo de A. altiparanae	56
Figura 38.	Eletronmicrografia de varredura de testículo de A. altiparanae	56
Figura 39.	Eletronmicrografia de varredura de testículo de A. altiparanae	56
Figura 40.	Corte do testículo de <i>A. altiparanae</i> submetido à reação imuno- histoquímica contra receptor de andrógeno	57
Figura 41.	Corte do testículo de <i>A. altiparanae</i> submetido à reação imuno- histoquímica contra receptor de andrógeno	57
Figura 42.	Corte do testículo de <i>A. altiparanae</i> submetido à reação imuno- histoquímica contra receptor de andrógeno	57
Figura 43.	Corte do testículo de <i>A. altiparanae</i> submetido à reação imuno- histoquímica contra receptor de andrógeno	57
Figura 44.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> submetido à reação de imunoperoxidase contra claudina-1	58
Figura 45.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> submetido à reação de imunoperoxidase contra claudina-1	58
Figura 46.	Reação imuno-histoquímica de fluorescência contra citoqueratina em testículo de <i>A. altiparanae</i>	59
Figura 47.	Reação imuno-histoquímica de fluorescência contra citoqueratina em testículo de <i>A. altiparanae</i>	59
Figura 48.	Detecção imuno-histoquímica de actina em testículo de A. altiparanae	60
Figura 49.	Detecção imuno-histoquímica de actina em testículo de A. altiparanae	60
Figura 50.	Detecção imuno-histoquímica de actina em testículo de A. altiparanae	60
Figura 51.	Detecção imuno-histoquímica de actina em testículo de A. altiparanae	60
Figura 52.	Corte de testículo de A. altiparanae submetido à reação de	

	imunofluorescência contra colágeno do tipo I	61
Figura 53.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> submetido à reação de imunofluorescência contra colágeno do tipo I	61
Figura 54.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> submetido à reação de imunofluorescência contra colágeno do tipo I	61
Figura 55.	Detecção imuno-histoquímica de laminina em testículo de <i>A. altiparanae</i>	62
Figura 56.	Detecção imuno-histoquímica de laminina em testículo de <i>A.</i> altiparanae	62
Figura 57.	Detecção imuno-histoquímica de fibronectina em testículo de A. altiparanae	63
Figura 58.	Detecção imuno-histoquímica de fibronectina em testículo de A. altiparanae	63
Figura 59.	Detecção imuno-histoquímica de fibronectina em testículo de A. altiparanae	63
Figura 60.	Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra receptor de andrógeno	64
Figura 61.	Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra receptor de andrógeno	64
Figura 62.	Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra claudina-1	64
Figura 63.	Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra citoqueratina	64
Figura 64.	Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra actina	64
Figura 65.	Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra actina	64
Figura 66.	Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra colágeno do tipo I	64
Figura 67.	Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra laminina	64
Figura 68.	Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra fibronectina	64

Figura 69.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> , corado com HE, evidenciando oócito de aparência anormal	65
Figura 70.	Corte de testículo de <i>A. altiparanae</i> , corado com HE, evidenciando oócito vitelogênico	65
Figura 71.	Eletronmicrografias de varredura de testículo de <i>A. altiparanae,</i> evidenciando oócito presente na luz do túbulo	65
Figura 72.	Eletronmicrografias de varredura de testículo de <i>A. altiparanae</i> com oócitos presentes no interior do testículo	65
Figura 73.	Ocorrência do intersexo por coleta no testículo de A. altiparanae	66

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de <i>A. altiparanae</i> no estádio de regredido	44
Tabela 2 -	Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de <i>A. altiparanae</i> no estádio de maturação inicial	44
Tabela 3 -	Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de <i>A. altiparanae</i> no estádio de maturação média	45
Tabela 4 -	Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de <i>A. altiparanae</i> no estádio de maturação final	45
Tabela 5 -	Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de <i>A. altiparanae</i> no estádio de regressão	45
Tabela 6 -	Análise do parâmetro "interstício" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 30,21%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05)	46
Tabela 7 -	Análise do parâmetro "luz com células" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 33,23%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05)	46
Tabela 8 -	Análise do parâmetro "cistos" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 34,7%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05)	47
Tabela 9 -	Análise do parâmetro "espermatogônia" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 69,55%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05)	47
Tabela 10 -	Análise do parâmetro "epitélio de ducto" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 141,36%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05)	47
Tabela 11 -	Análise do parâmetro "luz sem células" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 278,22%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05)	48

# LISTA DE ABREVIATURAS

- A. altiparanae Astyanax altiparanae
- AB Alcian Blue, ou azul de Alcião
- CI compartimento intersticial
- Coef. Var. coeficiente de variação
- CMP célula mióide peritubular
- CS célula secretora
- Ed espermátide
- Eg espermatogônia
- EpG epitélio germinativo
- EPdM erro padrão da média
- EPM espermatócito primário em metáfase
- EPP espermatócito primário em prófase
- ES epitélio secretor
- Ez espermatozóide
- FC fibrilas colágenas
- HE hematoxilina e eosina
- L lipídio
- LT luz do túbulo
- N núcleo
- Ne nuage
- Nu nucléolo
- Oc oócito
- PAS periodic acid-Schiff reactive ou ácido periódico reativo de Schiff
- PE porção espermatogênica
- PS porção secretora
- RNAm RNA mensageiro
- Se secreção

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE Astyanax altiparanae	21
2.2 TESTÍCULOS DOS VERTEBRADOS	21
2.3 SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DE TESTÍCULO DE TELEÓSTEOS	23
2.4 Compartimento Germinativo e Intersticial do Testículo de	
Teleósteos	25
2.5 RECEPTOR DE ANDRÓGENO	27
2.6 JUNÇÃO OCLUSIVA E CITOESQUELETO	28
2.7 A MEMBRANA BASAL E OS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO	
TESTÍCULO	29
2.8 INTERSEXO	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Coleta do Material	33
4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	33
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	34
4.4 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA VARREDURA	35
4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA	35
4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE PEROXIDASE	36
5 RESULTADOS	38
5.1 DESCRIÇÃO ANATÔMICA DO TESTÍCULO DE <i>A. altiparanae</i>	38
5.2 DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DO TESTÍCULO DE A. altiparanae	38
5.3 Estádios de Maturação Gonadal	40
5.4 Análise Morfométrica do Testículo de Lambari	42
5.5 ULTRAESTRUTURA DO TESTÍCULO DE A. altiparanae	50
5.6 REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	57
5.6.1 Receptor de Andrógeno	57
5.6.2 CLAUDINA-1	58

5.6.3 Componentes do Citoesqueleto	58
5.6.3.1 CITOQUERATINA	59
<u>5.6.3.2 Actina</u>	59
5.6.4 Componentes da Matriz Extracelular	60
5.6.4.1 COLÁGENO DO TIPO I	61
5.6.4.2 LAMININA	62
5.6.4.3 FIBRONECTINA	62
5.7 Ocorrência de Intersexo	64
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78

# 1 INTRODUÇÃO

O lambari do rabo amarelo ou tambiú (*Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000), apresentado na figura 1, pertence à família Characidae. Tal espécie é representante da subfamília Tetragonopterinae, que é um dos grupos mais importantes de peixes no Brasil (Orsi et al., 2004). Segundo Martinez e Cólus (2002), esta é uma espécie neotropical de grande importância ecológica, econômica e comercial, sendo amplamente distribuída na bacia do Rio Paraná.



Figura 1. Fotografia de um exemplar de *A. altiparanae* macho com aproximadamente 11 cm de tamanho.

O testículo da maioria dos peixes teleósteos apresenta algumas modificações durante seu ciclo gonadal, tais como alterações de seu peso, volume, forma e coloração. Estas mudanças são acompanhadas por alterações histológicas que culminam na produção e liberação dos espermatozóides.

Diversos são os trabalhos que descrevem as alterações histológicas das gônadas de peixes teleósteos. A maioria destes estudos está relacionada às espécies de clima temperado, sendo que poucos são os trabalhos que descrevem a morfologia dos testículos de teleósteos brasileiros, incluindo *A. altiparanae*.

O presente trabalho apresenta um estudo morfológico do testículo de *A. altiparanae*, onde foram utilizadas técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica e análise morfométrica, o que revelou importantes aspectos sobre o comportamento deste órgão ao longo do ciclo gonadal.

Através de técnicas imuno-histoquímicas, este trabalho apresenta a distribuição de receptor de andrógeno, da proteína de junção celular claudina-1, de

colágeno do tipo I, das glicoproteínas de matriz extracelular laminina e fibronectina, de citoqueratina e de actina no testículo de *A. altiparanae.* 

Foi também apresentado neste trabalho a capacidade do *A. altiparanae* macho desenvolver o intersexo, caracterizado pela presença de células germinativas femininas no interior dos testículos destes animais.

# 2 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE Astyanax altiparanae

O gênero Astyanax, pertencente à família Characidae, corresponde à maior unidade dos Tetragonopterinae, sob o ponto de vista sistemático, e constitui um dos gêneros dominantes da América do Sul (Eigenmann, 1921).

Anteriormente, o lambari de rabo amarelo era identificado como Astyanax bimaculatus, porém, através de recentes revisões morfológicas e filogenéticas, foi classificado como Astyanax altiparanae (Garutti e Britski, 2000), sendo a espécie Astyanax bimaculatus considerada restrita aos rios do Suriname (Prioli, 2002).

É possível observar dimorfismo sexual em *Astyanax altiparanae*, sendo que os machos, além de serem menores, são frequentemente mais tardios no crescimento (Porto-Foresti et al., 2005; Sato et al., 2006). No período reprodutivo, os machos apresentam a nadadeira anal áspera ao toque, sendo uma característica importante para a sua identificação (Porto-Foresti et al., 2005).

Com relação ao comportamento reprodutivo, Ihering e Azevedo (1936) e Agostinho et al. (1984), estudando o *Astyanax bimaculatus* que àquela época também englobava o *A. altiparanae*, relataram que a espécie apresentava desova parcelada, ocorrendo entre novembro e fevereiro. Segundo Almeida (2007), a ocorrência do processo de reprodução parcelada em *Astyanax altiparanae* constitui um fator importante no cultivo do lambari, podendo viabilizar a obtenção de três a quatro desovas durante o ano.

Outro dado interessante sobre o comportamento reprodutivo desta espécie é em relação à idade de maturação gonadal. Santos et al. (1991) relataram que em condições naturais a idade estimada da primeira maturação ocorre por volta dos três anos de idade. Porém, em situação de cultivo, estimou-se que a maturação deve ocorrer no quarto mês de vida (Silva, 1996).

# 2.2 TESTÍCULOS DOS VERTEBRADOS

Os cordados apresentam em seus testículos dois compartimentos conhecidos como germinal e intersticial, que são estruturalmente separados através da membrana basal. Cada compartimento possui tipos celulares que refletem suas atribuições funcionais. O compartimento germinal é formado por três elementos: as células de Sertoli, as células germinativas e a membrana basal (Grier, 1993). O compartimento intersticial é formado por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células de Leydig (Bouma e Cloud, 2005).

Nos répteis, aves e mamíferos a espermatogênese ocorre em uma estrutura permanente, chamada de túbulo seminífero. Porém, nos peixes e anfíbios, a espermatogênese é cística, compreendida por células de Sertoli que circundam as células germinativas (Bouma e Cloud, 2005).

Nos peixes e anfíbios a espermatogênese se inicia com a formação dos cistos espermatogênicos. Tais cistos são formados quando as células de Sertoli envolvem as espermatogônias primárias que, através de divisões mitóticas, formam as espermatogônias secundárias (Pudney, 1995; Bouma e Cloud, 2005; Batlouni et al., 2005). Posteriormente, as divisões meióticas se iniciam e dão origem aos espermatozóides, que são liberados na luz do túbulo como resultado do rompimento da parede dos cistos (Bouma e Cloud, 2005).

A espermatogênese dos peixes segue um padrão similar à dos outros vertebrados, porém, apresenta diferenças importantes. Em mamíferos, o epitélio germinativo permanece constante através do ano, ou apresenta mudanças cíclicas em mamíferos sazonais, mas em ambos os casos, as células de Sertoli dos mamíferos não proliferam durante a espermatogênese e fornecem suporte para sucessivas gerações de células germinativas (Sinha-Hikim et al., 1988). Em teleósteos, o compartimento germinal também pode ser constante ou apresentar mudanças cíclicas, no entanto, em ambos os casos, a espermatogênese ocorre em uma estrutura cística, na qual todas as células germinativas se desenvolvem sincronicamente, circundadas por células de Sertoli que também proliferam (Chavez-Pozo et al., 2005).

Com relação à distribuição de espermatogônias no testículo de peixes, Grier (1993) descreveu que, nestes animais, existem dois tipos de testículos: o espermatogonial restrito e o espermatogonial irrestrito. O testículo espermatogonial restrito possui as espermatogônias limitadas à porção distal dos lóbulos. Por outro lado, nos testículos do tipo espermatogonial irrestrito, as espermatogônias não possuem localização definida, podendo ser encontradas ao longo de todo o comprimento dos lóbulos ou túbulos.

## 2.3 SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DE TESTÍCULO DE TELEÓSTEOS

Existe um grande número de sistemas de classificação do ciclo reprodutivo de testículos de peixes. Geralmente, estes sistemas sugerem a divisão do processo de maturação gonadal em cinco ou nove estágios, sendo alguns considerados universais, enquanto outros foram desenvolvidos para uma determinada espécie. Além disso, há variações nos critérios de avaliação, pois enquanto alguns autores enfatizam o critério macroscópico, outros focam aspectos histológicos ou fisiológicos (Dziewulska e Domagala, 2003).

Na tentativa de gerar uma padronização, Grier (2002) propôs um método para estabelecer estádios do ciclo reprodutivo do testículo de peixes, baseando-se em um grupo de características-padrão que são amplamente reconhecidas em várias espécies.

No método sugerido por Grier (2002) a análise da continuidade do epitélio germinativo é utilizada para estabelecer os critérios de classificação, podendo ser contínuo e descontínuo. Assim, o epitélio germinativo é considerado contínuo quando está composto por cistos dispostos lado a lado, sem intervalos. Por outro lado, quando são encontrados cistos esparsos, separados por regiões que contenham somente células de Sertoli, o epitélio germinativo é considerado descontínuo, e é o resultado da liberação dos espermatozóides para a luz do túbulo sem que tais cistos sejam repostos.

Além disso, no método proposto por Grier (2002) também são observadas as fases de desenvolvimento das células germinativas, a maturação dos cistos e a quantidade de espermatozóides liberados na luz do túbulo. Desta forma, é possível encontrar cinco fases de desenvolvimento da gônada de peixes machos: regredido, maturação inicial, maturação média, maturação final e regressão (Grier, 2002).

Apesar da tentativa de padronização, não são todos os autores que seguem os critérios de classificação propostos por Grier (2002) e outros métodos são empregados para estabelecer os estádios do desenvolvimento gonadal de peixes machos.

Chavez-Pozo et al. (2005), descreveram o ciclo reprodutivo do testículo de *Sparus auratus*, dividindo o ciclo em quatro fases, que são: espermatogênese, espermiação, pós-espermiação e repouso. Durante a espermatogênese, o epitélio germinativo estava formado por cistos, e esta fase foi dividida em três subfases, que são: maturação inicial, com raros espermatozóides presentes na luz do túbulo; maturação média, com poucos espermatozóides na luz do túbulo; e maturação final, com grande quantidade de espermatozóides na luz do túbulo.

Na classificação empregada por Chavez-Pozo et al. (2005), a fase de espermiação foi caracterizada pela presença de espermatozóides na luz dos túbulos, porém, o epitélio germinativo estava formado exclusivamente por espermatogônias e células de Sertoli. Já a fase de pós-espermiação foi caracterizada quando a maioria dos espermatozóides foi liberada e a luz dos túbulos diminuiu de tamanho, enquanto na fase de repouso foram encontrados cistos de espermatogônias e espermatogônias tronco, com ausência da luz dos túbulos.

Uma classificação adicional foi utilizada por Santos et al. (2006) para descrever o ciclo reprodutivo do testículo de *Oligosarcus hepsetus*, um peixe brasileiro da família Characidae. Estes autores descreveram os seguintes estádios do ciclo gonadal: repouso, maturação inicial, maturação final, maduro, parcialmente esgotado e totalmente esgotado.

Batlouni et al. (2006) descreveram o ciclo reprodutivo de *Pseudoplatystoma fasciatum* machos. Segundo tais autores, a diferenciação entre testículos que se apresentavam em maturação inicial e testículos em maturação média só foi possível devido à utilização do método proposto por Grier (2002), ou seja, pela análise das alterações do epitélio germinativo.

Todas as classificações descritas acima se aplicam aos peixes que apresentam espermatogênese descontínua, ou seja, que apresentam reprodução sazonal. Porém, também são encontrados peixes que produzem espermatozóides ao longo de todo o ano (Nóbrega e Quagio-Grassioto, 2007). Neste caso, os métodos de classificação do ciclo gonadal não são aplicáveis.

Um exemplo de espécie que apresenta a espermatogênese contínua é o *Serrasalmus spilopleura*, um peixe da família Characidae, popularmente conhecido como piranha. O estudo morfológico do testículo deste animal revelou que existem duas regiões funcionalmente distintas, chamadas de região cortical, onde os espermatozóides são armazenados, e de região medular, que é a espermatogênica e que produz espermatozóides continuamente (Nóbrega e Quagio-Grassioto, 2007).

Devido às diversas formas de ciclo reprodutivo apresentadas pelos peixes, é difícil estabelecer um único método de classificação dos estádios do ciclo gonadal de peixes machos.

## 2.4 COMPARTIMENTO GERMINATIVO E INTERSTICIAL DO TESTÍCULO DE TELEÓSTEO

O epitélio germinativo é formado por células de Sertoli e células da linhagem germinativa que, através de divisões meióticas, são capazes de gerar os espermatozóides.

As células da linhagem germinativa são as espermatogônias, os espermatócitos I, os espermatócitos II, as espermátides e os espermatozóides (Grier, 1993; Dziewulska e Domagala, 2003; Chavez-Pozo et al., 2005; Batlouni et al., 2006).

As espermatogônias são as maiores células do epitélio germinativo, com citoplasma volumoso contendo "nuages" próximas à membrana nuclear, ou ainda próximas às mitocôndrias, formando o cimento mitocondrial (Batlouni et al., 2006). As "nuages" são estruturas eletrondensas de diversos tamanhos, não são envoltas por membranas e podem estar presentes em todas as fases do ciclo de vida destas células (Quagio-Grassioto e Carvalho, 1999). Estas estruturas apresentam vários tipos de RNAs, proteínas, citocromos e lipídios (Toury et al., 1977).

Segundo Chavez-Pozo et al. (2005), é possível diferenciar as espermatogônias tronco das espermatogônias primárias, através da utilização de métodos morfológicos. As espermatogônias primárias são envoltas por células de Sertoli, formando o cisto espermatogênico, e antes do processo meiótico começar, as espermatogônias primárias se proliferam, gerando as espermatogônias secundárias (Kavamoto et al., 1998; Dziewulska e Domagala, 2003).

Recentemente, Schulz et al. (2009) propuseram o emprego da mesma terminologia utilizada para as células germinativas dos vertebrados mais derivados. Tais autores afirmam que espermatogônias indiferenciadas dão origem às espermatogônias diferenciadas, que mantêm algumas características morfológicas das espermatogônias indiferenciadas, porém, sem o mesmo potencial de auto-renovação. Posteriores alterações morfológicas são responsáveis por originar as espermatogônias do tipo B que apresentam a característica de se dividirem com maior velocidade, o que gera uma grande população desse tipo celular. Após a última divisão mitótica, a espermatogônia B se diferencia em espermatócito primário (preleptotênico).

Os espermatócitos primários apresentam-se agrupados em cistos e são células esferoidais, menores que as espermatogônias. O núcleo é volumoso em

relação ao citoplasma e o nucléolo normalmente não é visível. Os espermatócitos primários realizam a primeira divisão meiótica, resultando na formação das células chamadas de espermatócitos secundários que, por sua vez, terminam a divisão meiótica, originando as espermátides (Kavamoto et al., 1998).

Em seguida, as espermátides passam pelo processo de espermiogênese, fase onde não ocorre proliferação celular (Schulz et al., 2009). Este processo é marcado por transformações nucleares e citoplasmáticas, fazendo com que as espermátides se diferenciem em espermatozóides maduros (Grier, 1981).

Em algumas espécies de peixes a espermatogênese é considerada cística, e nestes casos, ela é completada dentro dos cistos. Por outro lado, outras espécies têm a espermiogênese finalizada após o rompimento dos cistos, sendo a espermatogênese chamada de semicística (Mattei et al., 1993).

Por apresentarem diferentes modos de reprodução, a morfologia dos espermatozóides dos teleósteos varia dentre as espécies. Um tipo primitivo de espermatozóide, chamado de "aquaesperma", é encontrado na maioria das espécies que liberam seus espermatozóides na água e que apresentam fertilização externa. Estes espermatozóides apresentam núcleo arredondado, ausência de acrossomo, e peça intermediária curta, onde são encontradas mitocôndrias (Grier, 1981; Lo Nostro et al., 2003).

Os espermatozóides de *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) possuem núcleo arredondado e somente um flagelo (Batlouni et al., 2006). Por outro lado, os espermatozóides de *Symbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae) possuem dois flagelos, sendo que cada um deles utilizam um dos centríolos como corpúsculo basal (Lo Nostro et al., 2003).

As células de Sertoli são as únicas células somáticas presentes no compartimento germinativo dos cordados. Tais células oferecem nutrientes e fatores de crescimento que são necessários para a sobrevivência das espermatogônias e para a produção de espermatozóides (Bouma e Cloud, 2005).

Inicialmente, as células de Sertoli dos anamniotas são pouco desenvolvidas e suas projeções citoplasmáticas, que formam as paredes dos cistos, são finas, contendo pouco conteúdo citoplasmático. No entanto, após o desenvolvimento e maturação dos cistos, as células de Sertoli contêm retículo endoplasmático rugoso e liso bastante desenvolvidos, lisossomos e gotículas de lipídios (Bouma e Cloud, 2005). Grier (1993) cita a bipotencialidade das células de Sertoli dos peixes cartilaginosos, de alguns peixes ósseos, e de alguns anfíbios. Segundo tal autor, durante a espermatogênese, as células de Sertoli formam a parede dos cistos, porém, após a espermiação, em algumas espécies, tais células apresentam modificações morfológicas, tornam-se prismáticas e assumem a função de revestimento dos ductos espermáticos.

O compartimento intersticial do testículo de peixes é constituído de células mióides peritubulares, fibroblastos, fibras de colágeno, células de Leydig, nervos amielínicos, macrófagos e capilares (Grier, 1981; Cinquetti e Dramis, 2003).

As células de Leydig sofrem mudanças cíclicas em teleósteos que apresentam reprodução sazonal. Nos períodos de maturação testicular, tais células apresentam citoplasma repleto de mitocôndrias e de organelas relacionadas à síntese de esteróides. Porém, ao final do ciclo reprodutivo, as células de Leydig apresentam alterações citoplasmáticas, tais como danos mitocondriais, vacuolização citoplasmática e aumento no número de lisossomos (Van Vuren e Soley, 1990; Lo Nostro et al., 2004).

As células mióides peritubulares se parecem com células musculares lisas, contém núcleo alongado, com acúmulo de heterocromatina em sua periferia, citoplasma rico em filamentos que formam corpos densos no lado interno do plasmalema (Cinquetti e Dramis, 2003). Através de contatos focais, estas células se ligam às fibrilas de colágeno adjacentes (Lo Nostro et al., 2004). Grier et al. (1989) sugeriram que estas células poderiam formar uma rede contrátil que facilitaria a expulsão dos espermatozóides dos túbulos ou lóbulos.

# 2.5 RECEPTOR DE ANDRÓGENO

Atualmente, é bem conhecido que os andrógenos desempenham uma função central na masculinização do trato reprodutivo, genitália e muitos outros órgãos durante o processo de diferenciação sexual dos machos (Hughes, 2001; Sultan et al., 2001). Também é aceito que a ação dos andrógenos sobre o túbulo seminífero é requerida para que a espermatogênese seja quantitativamente normal e completa. A maioria das evidências aponta para a célula de Sertoli como a responsável por mediar tais efeitos (Sharpe, 1994; Hill et al., 2004; Sharpe, 2005).

Em roedores, durante a maior parte do período de proliferação, as células de Sertoli não apresentam receptor de andrógeno. Este fato levou os cientistas a considerarem que os andrógenos influenciavam pouco na proliferação das células de Sertoli (Hill et al., 2004; Sharpe et al., 2003; Bremer et al., 1994). No entanto, dados obtidos a partir de camundongos que não possuem receptores funcionais de andrógenos mostram que os hormônios andrógenos possuem função fisiológica na proliferação das células de Sertoli nos períodos fetal e início da vida pós-natal (Johnston et al., 2004).

Os receptores de andrógenos são membros de uma família de proteínas de receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição dependente de ligantes. Os receptores de andrógenos medeiam o efeito da masculinização dos andrógenos em diferentes partes do sistema reprodutivo e em diferentes fases da ontogênese (Waal et al., 2008).

Vários trabalhos têm mostrado que os receptores de andrógenos de peixes também participam de diversas atividades biológicas, como exemplificadas pela ação dos andrógenos sobre as características sexuais secundárias, comportamento, espermatogênese e produção de andrógenos pelas células de Leydig (Pall et al., 2002a; Pall et al., 2002b; Miura et al., 1991; Cavaco et al., 1999; Cavaco et al., 2001).

Wall et al. (2008) mostraram que as células de Sertoli de Danio rerio, popularmente conhecido como paulistinha ou "zebrafish", apresentam diferenças quanto à expressão de RNAm de receptor de andrógeno. Tais autores verificaram que somente as células de Sertoli que envolvem as espermatogônias primárias expressam altos níveis de RNAm de receptor de andrógeno.

Apesar da importância dos receptores de andrógeno nos vertebrados, poucos são os estudos que visam esclarecer a presença e distribuição destes receptores nos testículos de peixes teleósteos sul americanos. Desta forma, a análise destas proteínas no testículo de lambari apresentada neste trabalho é de grande interesse científico, contribuindo para aumentar a compreensão da biologia deste órgão.

#### 2.6 JUNÇÃO OCLUSIVA E CITOESQUELETO

As junções oclusivas constituem uma barreira à passagem de íons e moléculas através do espaço paracelular e funcionam como um cinturão envolvendo

as membranas plasmáticas de células adjacentes, sendo responsável por manter diferenças entre os domínios apical e basal (Turksen e Troy, 2004). A família das claudinas, primeiramente descrita por Furuse et al. (1998), está presente nestas junções e a elas são atribuídas as funções de permeabilidade e barreira epitelial das junções oclusivas (Morrow et al., 2010).

As proteínas da família das claudinas apresentam peso molecular variando entre 22 e 27 kDa e são proteínas integrais de membrana que possuem 4 domínios hidrofóbicos, duas alças extracelulares envolvidas nas interações homofílicas e/ou heterofílicas. A cauda citoplasmática, apesar de tamanho relativamente constante, apresenta variação da sequência de aminoácidos, o que sugere diferentes funções como interação com outras proteínas, possíveis sítios de fosforilação, e interação com outras proteínas que formam as junções oclusivas (Turksen e Troy, 2004).

No testículo, as junções oclusivas existentes entre células de Sertoli adjacentes constituem a barreira hematotesticular, a qual é crucial para formar um ambiente fisiológico no túbulo seminífero para a espermatogênese e para a proteção das células germinativas de reações auto-imunes do sistema imunológico (Dym e Fawcett, 1970; Park et al., 2011).

Nos mamíferos, a formação da barreira hematotesticular é uma das funções desempenhadas pela célula de Sertoli e assim, ao citoesqueleto é atribuído um papel fundamental para que esta função seja desempenhada (Boekelheide et al., 1989). Vários são os estudos que sugerem que a função das junções oclusivas está relacionada à organização da actina associada a esta junção (Nybom e Magnusson, 1996; Fanning et al., 1999).

Os filamentos intermediários também estão envolvidos na estruturação de diversas junções extracelulares, tais como desmossomos e hemidesmossomos, e devido a este fato, também tem sido alvo de estudos nos testículos de vertebrados (Arenas et al., 1995; Pfeifer e Vogl, 2002; Batlouni et al., 2005).

Desta forma, o estudo das proteínas do citoesqueleto e da distribuição destes compostos nas células dos compartimentos germinal e intersticial do testículo de *A. altiparanae* é de grande interesse científico para o melhor entendimento deste órgão.

2.7 A MEMBRANA BASAL E OS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO TESTÍCULO

Segundo Grier (1992), o processo evolutivo pode ter levado ao surgimento dos testículos lobulares ou tubulares dos vertebrados mais derivados a partir do testículo poliespermatocístico apresentados pelos agnatas (lampréias) e elasmobrânquios.

Diferentemente do que acontece para os agnatas e elasmobrânquios, nos testículos lobulares ou tubulares apresentados pela maioria dos peixes ósseos, os compartimentos germinal e intersticial são mantidos separados através da membrana basal, que é responsável por fornecer suporte tanto às células de Sertoli como às células da linhagem germinativa (Grier, 1992).

Este fato levou Grier (1992) a postular a "hipótese da matriz extracelular", que visa esclarecer a importância da membrana basal para o testículo dos cordados. Segundo esta hipótese, durante a ontogênese testicular, o momento em que a membrana basal surge é decisivo para a organização deste órgão.

Apesar da importância da matriz extracelular, poucos são os dados disponíveis na literatura sobre a presença e distribuição de componentes da matriz extracelular em tecidos de peixes. A análise da constituição da matriz extracelular dos tecidos que constituem o testículo de peixes é de extrema importância para que se compreenda a biologia deste órgão.

## 2.8 INTERSEXO

O termo intersexo é usado para descrever a presença de características masculinas e femininas em um único peixe (Hinck et al., 2009) e é comumente utilizado para descrever a presença de células germinativas femininas no interior de testículo de peixes (Nolan et al., 2001). No entanto, este termo também tem sido usado para descrever células germinativas masculinas dentro de uma gônada feminina (Vine et al., 2005).

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento do intersexo não são completamente conhecidos, mas muitos fatores, tais como esteróides exógenos, temperatura, pH da água e poluentes podem influenciar na diferenciação sexual dos peixes (Devlin e Nagahama, 2002).

Nos últimos anos diversos pesquisadores têm focado seus estudos na avaliação do efeito perturbador que alguns compostos químicos são capazes de reproduzir em diversos organismos. Hinck et al. (2009) publicaram um trabalho que

revelou alta incidência de intersexo no gênero *Micropterus spp.* e relacionou tal fato com as ações antrópicas responsáveis pela poluição das águas

No presente trabalho, o termo intersexo foi utilizado para se referir a animais que apresentaram células germinativas femininas no interior de seus testículos.

# **3 OBJETIVOS**

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever as alterações morfológicas do testículo de *Astyanax altiparanae*, ao longo do ciclo gonadal, utilizando métodos estruturais, alguns deles apoiados em avaliações morfométricas, imuno-histoquímicos e ultraestruturais.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Responder total ou parcialmente as seguintes questões:

- Quais os estádios do testículo de A. altiparanae durante o ciclo reprodutivo?

 É possível determinar, através de métodos quantitativos, os estádios do ciclo reprodutivo?

- Qual a distribuição de componentes da matriz extracelular (colágeno do tipo I, laminina e fibronectina) no testículo de *A. altiparanae*? Estes compostos modificam sua distribuição ao longo do ciclo gonadal?

- Qual a constituição do citoesqueleto de células que compõem o testículo de *A. altiparanae*? Há a presença da proteína de junção celular claudina-1?

- Quais células do testículo de *A. altiparanae* possuem receptor de andrógeno? A presença e localização do receptor de andrógeno se modificam ao longo do ciclo gonadal?

# **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 COLETA DO MATERIAL

Foram coletados 140 lambaris do rabo amarelo *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000) machos na Estação de Piscicultura do Clube de Campo Scandolo, localizada em Andirá-PR e também na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Usina Hidrelétrica *Duke Energy*, Salto Grande-SP.

Os peixes foram transportados em sacos plásticos contendo água e oxigênio até o campus da Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel. Imediatamente após o transporte, os peixes foram anestesiados com benzocaína, anotados o peso e comprimento corpóreo. Em seguida, as cavidades abdominais foram abertas com auxílio de tesoura cirúrgica e os testículos cuidadosamente dissecados.

As gônadas foram fixadas por imersão em quatro diferentes fixadores: Methacarn, formaldeído a 4% preparado a partir do pó, Bouin acético e Karnovsky. O material destinado à inclusão em parafina foi rotineiramente processado.

## 4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para quantificar as alterações morfológicas que os testículos de *A. altiparanae* apresentaram durante os cinco estádios do ciclo reprodutivo, foi realizada a análise morfométrica deste órgão.

Foram capturadas imagens de cortes histológicos, de 5 µm de espessura, de testículos de *A. altiparanae* montados em lâminas e corados com HE, a partir de um microscópio de luz com ocular reticulada acoplada a uma câmera fotográfica digital (Moticam 3,0 megapixel).

A ocular reticulada continha um retângulo subdividido em 12 quadrados e, com a objetiva de 40 vezes, cada quadrado possuía uma área de 2500  $\mu$ m<sup>2</sup>. Para a contagem foram considerados os 20 pontos de interseção existentes na imagem, sendo que um ponto possuía 50  $\mu$ m de distância dos outros pontos mais próximos.

De um banco de fotomicrografias foram sorteadas 30 fotomicrografias de cada um dos estádios, previamente classificados de acordo com o método da continuidade do epitélio germinativo (Grier, 1998), totalizando 150 fotomicrografias.

Os parâmetros analisados para cada uma das fotomicrografias foram: luz do túbulo sem células, luz com células, epitélio germinativo (cistos de espermatócitos e espermátides), espermatogônias, epitélio de ductos e interstício.

Após as contagens, foram obtidas as médias aritméticas das contagens para cada parâmetro, em cada um dos estádios analisados. Ainda para cada estádio foram calculados, para cada parâmetro, o desvio padrão, o erro padrão da média e o coeficiente de variação, sendo este último calculado apenas para valores diferentes de zero.

Com auxílio do programa SASM-Agri (Canteri et al., 2001), os dados de cada um dos parâmetros foram agrupados em blocos casualizados, realizado tratamento estatístico pela análise da variância, seguido do teste Tukey, com nível de significância de p<0,05. Dessa forma, foi possível comparar os parâmetros entre os estádios do ciclo gonadal.

Para comparação morfométrica dos estádios de maturação gonadal entre as regiões caudal, mediana e cefálica do testículo, foram utilizadas nove fotomicrografias de três cortes semisequenciais de cada animal analisado, sendo três delas da região caudal, três da região mediana e três da região cefálica. Após as contagens dos mesmos parâmetros acima citados, as médias aritméticas foram obtidas.

Para as comparações morfométricas entre as regiões dorsal e ventral, foram utilizadas seis fotomicrografias de cada animal analisado, sendo três delas da região dorsal e três da região ventral.

Os gráficos foram produzidos através do programa Microsoft Office Excel 2007.

## 4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os testículos dez animais foram fixados em Karnovsky por um período mínimo de 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora. As amostras foram contrastadas por 1 hora em acetato de uranila e por 1 hora em citrato de chumbo e, em seguida, a desidratação foi realizada em série alcoólica de concentração crescente de etanol. A seguir, as amostras foram infiltradas com solução de resina/óxido nítrico 1:1 por 2 horas, infiltradas com resina Spurr por um

período de 12 horas e incluídas em formas de silicone. A resina foi polimerizada a 60 °C.

Após seleção das áreas de interesse, os cortes foram realizados em ultramicrótomo e coletados em telas de cobre. O material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai 12, do Laboratório de Microscopia e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

## 4.4 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA VARREDURA

Foram fragmentados oito testículos em pequenas secções transversais e fixados em Karnovsky, pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% por 3 horas. Em seguida, o material foi desidratado em banhos consecutivos de soluções alcoólicas de concentrações crescentes de etanol.

As gônadas foram submetidas ao ponto crítico de CO<sub>2</sub>, fixadas em suportes ("stubs"), e cobertas com ouro no metalizador.

As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 na Universidade Estadual de Londrina.

#### 4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA

Os cortes de testículo foram desparafinizados em xilol por 20 minutos e, após hidratação em série alcoólica decrescente, o material foi incubado em PBS por 5 minutos. Cortes destinados à detecção de colágeno do tipo I foram incubados, a 37°C por 20 minutos, com solução de pepsina de porco (Sigma) a 0,4% em solução de ácido acético 0,5N. Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando os cortes com PBS com leite em pó desnatado a uma concentração de 5% por 30 minutos. Após lavagens em PBS, o material foi incubado "overnight" a 4 °C com anticorpos primários diluídos em PBS. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-receptor de andrógeno, desenvolvido em coelho (Sigma-Aldrich, diluído 1:100); anti-colágeno do tipo I, feito em coelho (Rockland, 1:80); anti-pan-citoqueratina, feito em coelho (Rockland, 1:100); e anti-actina, desenvolvido em coelho (Sigma-Aldrich, 1:100). Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão dos anticorpos primários.
Após as lavagens com PBS/Tween a 0,05%, o material foi incubado com anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de coelho (Sigma) por um período de 1 hora à temperatura ambiente. Novas lavagens com PBS/Tween a 0,05% foram realizadas e os cortes foram incubados com streptavidina/FITC diluída em PBS (1:100). Em seguida, o excesso de streptavidina/FITC foi removido em lavagens com PBS/Tween a 0,05% e o material foi incubado com iodeto de propídio a 0,01 mg/mL por 3 minutos e lavados com PBS/Tween a 0,05%.

As lâminas foram montadas com PBS com glicerina (1:1) e vedadas com esmalte incolor.

### 4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE PEROXIDASE

As lâminas foram desparafinizadas em xilol por 20 minutos e, após hidratação em série alcoólica de concentração decrescente, o material foi incubado em PBS por 5 minutos. Lâminas destinadas à detecção de laminina foram incubadas, por 10 minutos a 25°C, com tripsina a 0,03%, diluída em solução de cloreto de cálcio 0,002 M, com pH de 7,8. Para bloqueio dos sítios inespecíficos, os cortes foram incubados com PBS com leite desnatado a 5% e, após lavagem em PBS, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado incubando as lâminas com PBS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%.

Os cortes foram incubados com o anticorpo primário diluído em PBS "overnight" a 4 °C. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-receptor de andrógeno, desenvolvido em coelho (Sigma-Aldrich, diluído 1:100); anti-claudina-1, desenvolvido em coelho (Acris Antibody Gmbh, diluído 1:500); anti- laminina, desenvolvido em coelho (Chemicon, diluído 1:60); e anti-fibronectina, desenvolvido em coelho (Chemicon, diluído 1:25). Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão dos anticorpos primários.

Após lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (Dako), por 30 minutos à temperatura ambiente. Após as lavagens com PBS o material foi incubado com estreptoavidina/peroxidase do kit Dako 0497 por um período de 1 hora à temperatura ambiente.

As revelações foram realizadas com uma solução de diaminobenzidina (DAB) em tampão para DAB do Kit Dako, com concentração de 20 µL/mL. O processo de revelação foi interrompido por banhos de água destilada. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em banhos de etanol com concentrações crescentes, e montadas com meio para montagem rápida (Entellan<sup>®</sup>) e lamínulas.

### **5 RESULTADOS**

#### 5.1 DESCRIÇÃO ANATÔMICA DO TESTÍCULO DE A. altiparanae

O testículo de *A. altiparanae* é um órgão par que se localizava nos dois lados da cavidade abdominal do animal, se estendendo da porção cefálica até a porção caudal, onde se conectava ao poro genital (Fig. 2). Sua forma, cor e tamanho variavam de acordo com a fase do ciclo gonadal.

Quando em fases iniciais do ciclo gonadal, os testículos se apresentavam translúcidos, com comprimento e diâmetro pequenos e frágeis à manipulação. Testículos em estádios mais avançados de maturação apresentavam maiores comprimento e diâmetro, tornavam-se esbranquiçados e mais rígidos, suportando melhor a manipulação, no entanto, mantinham algumas regiões translúcidas (Fig. 2).



Caudal Cefálica Figura 2. Fotografia de um testículo de *A. altiparanae.* Note a presença de regiões translúcidas e opacas. Na foto estão identificadas as regiões caudal e cefálica.

### 5.2 DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DO TESTÍCULO DE A. altiparanae

O testículo de *A. altiparanae* era envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo e no seu interior encontravam-se os túbulos seminíferos. Na sua porção caudal foram encontrados ductos anastomosados revestidos por um epitélio prismático simples cujas células de revestimento apresentavam citoplasma pouco corado pela eosina e possuíam indícios de atividade secretora (Fig. 3).



Figura 3. Corte histológico da região caudal do testículo de *A. altiparanae*, corado com HE, onde podem ser visualizadas as células colunares (setas) que possuem atividade secretora. Estas células revestem uma rede complexa de ductos, por onde passam os espermatozóides.

O testículo de *A. altiparanae* era do tipo túbulo anastomosado, tendo sido encontradas duas porções com diferentes funções, denominadas de espermatogênica e secretora (Fig. 4). A porção espermatogênica continha cistos espermatogênicos, onde ocorria a produção de espermatozóides, enquanto a porção secretora continha espermátides e espermatozóides imersos em secreção. Tais regiões apresentavam continuidade, não sendo evidenciados quaisquer limites morfológicos entre elas (Fig. 4).

Ao comparar testículos provenientes de animais distintos, foi observado que as porções espermatogênica e secretora variavam suas posições, não sendo possível estabelecer padrões de localizações anatômicas.

As células epiteliais que compunham a porção secretora apresentavam uma dinâmica estrutural bastante interessante, podendo ser prismáticas, cúbicas ou ainda pavimentosas (Fig. 5). As figuras 6, 7 e 8 mostram detalhes das células prismáticas, cúbicas ou pavimentosas, respectivamente. Algumas vezes foram encontradas espermatogônias entre as células secretoras (Fig. 9).

A secreção foi negativa às reações histoquímicas do ácido periódico-reativo de Schiff (PAS) e do azul de Alcião (AB) pH 2,5 (dados não apresentados).



Figuras 4 a 9. Cortes histológicos do testículo de *A. altiparanae*, corados com HE. Fig. 4. É possível visualizar a porção espermatogênica (PE) e a porção secretora (PS) do testículo. Fig. 5. Epitélio secretor com células de diferentes formas. Setas indicam células colunares, e cabeças de setas indicam células pavimentosas. A luz do túbulo (LT) está preenchida por secreção e células livres. Fig. 6. Note a secreção apócrina indicada pela cabeça de seta na superfície de células colunares. Fig. 7. Células cúbicas apontadas pela seta. Fig. 8. Células pavimentosas apontadas pelas setas.Fig. 9. Note a presença de uma espermatogônia (Eg) entre células do epitélio secretor.

5.3 ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO GONADAL

O testículo de lambari apresentou modificações estruturais ao longo do ciclo gonadal, e tais modificações serviram de base para a classificação deste órgão nos seguintes estádios: maturação inicial, maturação média, maturação final, regressão e regredido. No entanto, o testículo de um mesmo animal, frequentemente apresentava regiões em diferentes estádios de maturação, portanto, em cortes longitudinais de um único testículo, foi possível verificar regiões em diferentes estádios.

Durante a maturação inicial (Fig. 10), os túbulos apresentavam epitélio germinativo contínuo com a presença de cistos em diversos estádios da espermatogênese, com algumas poucas espermatogônias entremeadas aos cistos. Neste estádio a luz dos túbulos estava de tamanho reduzido, contendo um número pequeno de células livres no seu interior.

Durante a maturação média (Fig. 11), foi observada luz maior nos túbulos seminíferos, com mais células livres e secreção abundante, sendo encontrados também, no epitélio germinativo, cistos em diversos estádios de espermatogênese.

Na maturação final (Fig. 12), o epitélio germinativo se encontrava descontínuo, com raros cistos espaçados por células de Sertoli que não envolviam células da linhagem germinativa. Neste estádio um grande número de células livres imersas em secreção foi encontrado na luz bastante dilatada do túbulo, assim como a presença de um epitélio secretor.

No estádio de regressão (Fig. 13), o testículo apresentou uma transformação estrutural, com desorganização dos túbulos seminíferos e aumento do espaço ocupado pelo tecido intersticial. Além disso, foi possível visualizar núcleos de espermatozóides remanescentes ao lado de núcleos de outras células do epitélio, o que sugere uma reabsorção de espermatozóides residuais.

O estádio regredido (Fig. 14), proveniente de coletas nos meses de março e julho, foi raramente encontrado. Neste estádio, o epitélio germinativo se apresentou tomado por espermatogônias circundadas por células de Sertoli, não sendo encontrados cistos em quaisquer fases da espermatogênese. Outro aspecto a ser ressaltado é que o interstício apresentava-se bastante desenvolvido.

Na maioria das coletas o testículo encontrava-se dividido em regiões em diferentes estádios de maturação, porém, dos raros testículos que apresentavam todas as regiões em um só estádio, os das coletas dos meses de março e julho encontravam-se em regressão.



Figuras 10 a 14. Cortes de testículos de *A. altiparanae* em diferentes estádios de maturação, corados por HE. Fig. 10. Testículo em maturação inicial, epitélio germinativo contínuo com espermatogônias (setas) e cistos em diferentes estádios da espermatogênese. Fig. 11. Testículo em maturação média, epitélio germinativo descontínuo, com algumas espermatogônias e algumas células na luz do túbulo. Fig. 12. Testículo em maturação final, epitélio germinativo descontínuo (\*), note a presença de grande quantidade de células na luz do túbulo. Fig. 13. Testículo em regressão. Note a desorganização dos túbulos seminíferos e a presença de espermatozóides residuais em processo de reabsorção (setas). Fig. 14. Testículo regredido. Note a presença de espermatogônias (setas) envoltas por células de Sertoli (cabeças de seta).

5.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TESTÍCULO DE LAMBARI

Através de análise morfométrica do testículo de lambari, foram quantificadas as diferenças morfológicas entre os estádios regredido, maturação inicial, média, final e regressão. Os dados estão apresentados na figura 15.



Figura 15. Média do número de pontos obtidos da análise de trinta figuras de testículos de *A. altiparanae* em cada um dos estádios do ciclo gonadal . Os parâmetros analisados foram: luz do túbulo sem células, luz com células, cistos de espermatócitos ou espermátides, espermatogônias, epitélio do ducto e intestício.

Durante o estádio de maturação inicial, foi possível identificar uma predominância de epitélio germinativo contendo cistos de espermatócitos e espermátides, além de uma baixa ocorrência de luz de túbulo contendo espermatozóides. O estádio de maturação média foi semelhantemente caracterizado pela ocorrência de epitélio germinativo contendo cistos de espermatócitos e espermátides, e luz contendo espermatozóides. No estádio de maturação final foi encontrada predominância de luz contendo espermatozóides, e uma expressiva quantidade de ductos.

Os estádios de regressão e regredido apresentaram grandes diferenças entre si e também em relação aos demais estádios de maturação. O estádio de regressão apresentou um grande aumento do interstício em relação aos demais parâmetros analisados, enquanto o estádio regredido apresentou uma relação bastante similar entre a quantidade de pontos que caíram sobre o interstício e pontos que caíram sobre as espermatogônias. A análise do coeficiente de variação dos dados apresentados na figura 15 revelou que para cada um dos estádios do ciclo gonadal existiu pelo menos um parâmetro próximo de 30%. Para o estádio de regredido, o coeficiente de variação dos parâmetros espermatogônia e interstício foram de 34,9% e 29,4%, respectivamente (dados em destaque na tabela 1).

Tabela 1 – Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de *A. altiparanae* no estádio de regredido.

	Luz sem Células	Luz com Células	Cistos	Espermat <u>o</u> gônias	Epitélio de Ductos	Interstício
Média	0,0	0,0	0,0	9,1	0,0	11,0
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	3,2
EPdM	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,7
Coef. Var. (%)	0,0	0,0	0,0	34,9	0,0	29,4

No estádio de maturação inicial, o parâmetro cistos de espermatócitos e espermátides apresentou coeficiente de variação de 20,4% (dado em destaque na tabela 2).

Tabela 2 – Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de *A. altiparanae* no estádio de maturação inicial.

	Luz sem Células	Luz com Células	Cistos	Espermat <u>o</u> gônias	Epitélio de Ductos	Interstício
Média	0,7	1,9	13,8	0,7	0,1	2,7
Desvio padrão	0,9	2,0	2,8	0,9	0,7	1,9
EPdM	0,2	0,4	0,5	0,2	0,1	0,3
Coef. Var. (%)	123,7	101,6	20,4	123,7	547,7	70,6

No estádio de maturação média, os parâmetros luz sem células e cistos de espermatócitos e espermátides apresentaram coeficiente de variação de 30,3% e 25,6% (dados em destaque na tabela 3).

	Luz sem Células	Luz com Células	Cistos	Espermat <u>o</u> gônias	Epitélio de Ductos	Interstício
Média	0,0	9,2	9,6	0,4	0,2	0,5
Desvio Padrão	0,0	2,8	2,5	0,7	0,5	0,9
EPdM	0,0	0,5	0,4	0,1	0,1	0,2
Coef. Var. (%)	0,0	30,3	25,6	178,4	312,7	172,2

Tabela 3 – Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de *A. altiparanae* no estádio de maturação média.

No estádio de maturação final, o parâmetro luz com células apresentou o coeficiente de variação de 14,4 % (dado em destaque na tabela 4).

Tabela 4 – Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de *A. altiparanae* no estádio de maturação final.

	Luz sem Células	Luz com Células	Cistos	Espermat <u>o</u> gônias	Epitélio de Ductos	Interstício
Média	0,0	15,6	0,3	0,0	3,4	0,7
Desvio Padrão	0,0	2,2	1,0	0,0	2,1	1,0
EPdM	0,0	0,4	0,2	0,0	0,4	0,2
Coef. Var. (%)	0,0	14,4	340,7	0,0	62,0	149,1

Por fim, para o estádio de regressão, o parâmetro interstício apresentou o menor coeficiente de variação de 13,3% (dado em destaque na tabela 5).

Tabela 5 – Análise do coeficiente de variação dos parâmetros analisados nos testículos de *A. altiparanae* no estádio de regressão.

	Luz sem Células	Luz com Células	Cistos	Espermat <u>o</u> gônias	Epitélio de Ductos	Interstício
Média	0,2	0,0	0,0	1,5	0,2	18,0
Desvio padrão	0,8	0,0	0,0	2,0	1,1	2,4
EPdM	0,2	0,0	0,0	0,4	0,2	0,5
Coef. Var. (%)	322,7	0,0	0,0	136,5	458,3	13,3

A análise dos dados de cada um dos parâmetros agrupados em blocos casualizados, revelou que os parâmetros "interstício", "luz com células" e "cistos" apresentaram as menores média dos coeficientes de variação, enquanto os

parâmetros "espermatogônias", "epitélio de ductos" e "luz sem células" apresentaram médias de coeficientes de variação muito altas. Tais dados estão dispostos nas tabelas 6 a 11.

A tabela 6 mostrou que a média do parâmetro "interstício" foi significativamente maior no estádio de regressão, seguida pela média do estádio regredido, posteriormente, seguida pela média da maturação inicial. Por último, as menores médias foram apresentadas pelos estádios de maturação final e média, cuja diferença não foi significativa.

Tabela 6 – Análise do parâmetro "interstício" entre os estádios do ciclo gonadal. A média do coeficiente de variação foi de 30,21%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05).</p>

Estádio	Média	Teste Tukey
Regressão	18,07	а
Regredido	10,83	b
Maturação Inicial	2,67	С
Maturação Final	0,67	d
Maturação Média	0,5	d

A tabela 7 revelou que a média do parâmetro "luz com células" foi significativamente maior durante o estádio de maturação final, seguida pela maturação média e, posteriormente, pela maturação inicial. As diferenças entre as médias apresentadas pelos estádios regressão e regredido não foram significativas.

Tabela 7 – Análise do parâmetro "luz com células" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 33,23%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05).

Estádio	Média	Teste Tukey
Maturação Final	15,57	а
Maturação Média	9,23	b
Maturação Inicial	1,93	С
Regressão	0	d
Regredido	0	d

A tabela 8 revelou que a média do parâmetro "cistos" foi significativamente maior no estádio de maturação inicial, seguido pelo estádio de maturação média e maturação final. No entanto, as diferenças existentes entre as médias dos estádios maturação final, regressão e regredido não foram significativas.

Estádio	Média	Teste Tukey
Maturação Inicial	13,8	а
Maturação Média	9,6	b
Maturação Final	0,3	С
Regressão	0	С
Regredido	0	С

Tabela 8 – Análise do parâmetro "cistos" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 34,7%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05).

A tabela 9 demonstrou que a média do parâmetro "espermatogônia" foi significativamente maior no estádio regredido, seguido pelo estádio regressão. As diferenças entre as médias apresentadas pelos estádios maturação inicial, média e final não foram significativas.

Tabela 9 – Análise do parâmetro "espermatogônia" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 69,55%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias \_(p<0,05).

Estádio	Média	Teste Tukey
Regredido	9,17	а
Regressão	1,63	b
Maturação Inicial	0,73	bc
Maturação Média	0,37	С
Maturação Final	0	С

A tabela 10 revelou que a média apresentada pelo estádio de maturação final foi significativamente maior que a dos outros estádios.

Tabela 10 – Análise do parâmetro "epitélio de ducto" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 141,36%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05).

Estádio	Média	Teste Tukey
Maturação Final	3,43	а
Regressão	0,17	b
Maturação Média	0,17	b
Maturação Inicial	0,13	b
Regredido	0	b

A tabela 11 demonstrou que para o parâmetro "luz sem células" a média apresentada pelo estádio de maturação inicial foi significativamente maior que as médias dos demais estádios.

Tabela 11 – Análise do parâmetro "luz sem células" entre os estádios do ciclo gonadal. O coeficiente de variação foi de 278,22%. ANOVA seguida de teste Tukey para separação de médias (p<0,05).

Estádio	Média	Teste Tukey
Maturação Inicial	0,73	а
Regressão	0,17	b
Maturação Final	0	b
Maturação Média	0	b
Regredido	0	b

Dentro de um único testículo foram encontradas regiões em diferentes estádios do ciclo gonadal. As figuras 16, 17 e 18 representam três exemplos onde foram encontrados diferentes estádios em relação às regiões caudal, média e cefálica dos testículos de lambaris.



Figura 16. Média do número de pontos da análise de nove figuras de testículo de *A. altiparanae*, sendo três da região caudal, três da região média e três da região cefálica do testículo de um único animal. A região caudal apresentava-se em maturação final, a região média apresentava-se em maturação média, enquanto a região cefálica apresentava-se em maturação inicial. Animal coletado no mês de dezembro de 2007.



Figura 17. Média do número de pontos da análise de nove figuras de testículo de *A. altiparanae*, sendo três da região caudal, três da região média e três da região cefálica do testículo de um único animal. As regiões caudal e média apresentavam-se em maturação inicial, enquanto a região média apresentava-se em maturação final. Animal coletado no mês de agosto de 2007.



Figura 18. Média do número de pontos da análise de nove figuras de testículo de *A. altiparanae*, sendo três da região caudal, três da região média e três da região cefálica do testículo de um único animal. A região caudal apresentava-se em maturação inicial, a região média apresentava-se em maturação final, enquanto a região cefálica apresentava-se em maturação média. Animal coletado no mês de agosto de 2007.

Um dado bastante relevante é que foram encontrados diferentes estádios de maturação gonadal quando comparadas as regiões dorsal e ventral de um único testículo (Fig. 19).



Figura 19. Média do número de pontos da análise morfométrica de seis figuras de testículo de *A. altiparanae*, sendo três da região dorsal e três da região ventral do testículo de um único animal. A região dorsal apresentava-se em maturação média, enquanto a região ventral apresentava-se em maturação final. Animal coletado no mês de fevereiro de 2007.

No entanto, é válido ressaltar que também foram encontrados alguns poucos testículos que apresentavam as três regiões ao longo do comprimento do testículo de *A. altiparanae* no mesmo estádio de maturação, como demonstrado pela figura 20.



Figura 20. Média do número de pontos da análise morfométrica de nove figuras de testículo de *A. altiparanae*, sendo três da região caudal, três da região média e três da região cefálica do testículo de um único animal. As três regiões apresentavam-se em maturação inicial. Animal coletado no mês de agosto de 2007.

5.5 ULTRAESTRUTURA DO TESTÍCULO DE A. altiparanae

As células de Sertoli que envolviam espermatogônias isoladas ou agrupadas apresentavam citoplasma eletrondenso com poucas organelas (Fig. 21). As espermatogônias primárias mostraram núcleo arredondado com eucromatina, e nucléolo evidente localizado na periferia nuclear próximo ao envoltório. No citoplasma destas células foram encontradas nuages circundadas por mitocôndrias (Fig. 22).

Espermatogônias secundárias agrupadas, envoltas por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli, possuíam núcleo arredondado com áreas de eucromatina e heterocromatina e nucléolo arredondado. Entre as espermatogônias secundárias foram encontradas pontes citoplasmáticas (Fig. 23).

Espermatócitos em zigóteno apresentaram os elementos laterais do complexo sinaptonêmico que estavam dispostos de forma perpendicular ao envoltório nuclear (Fig. 24). Algumas vezes a distinção entre o citoplasma e núcleo não era óbvia em espermatócitos primários (Fig. 25). Espermatócitos em metáfase foram encontrados apresentando seus cromossomos na placa equatorial (Fig. 26).

Na luz do túbulo seminífero, frequentemente foram encontradas células arredondadas livres com diferentes diâmetros. As espermátides foram encontradas livres na luz dos túbulos seminíferos e apresentavam grande núcleo redondo com cromatina condensada, mas menos do que a dos espermatozóides, enquanto o citoplasma estava restrito a uma pequena faixa na periferia celular (Fig. 27). Por outro lado, os espermatozóides apresentaram núcleo com cromatina fortemente condensada, fossa nuclear, flagelo único e canal citoplasmático (Fig. 28).



Figuras 21 a 28. Cortes de testículo de *A. altiparanae* analisados por microscopia eletrônica de transmissão. Fig. 21. Espermatogônia primária mostrando núcleo (N) arredondado, nucléolo evidente (Nu), nuages (Ne), e mitocôndrias, envoltas por prolongamentos citoplasmáticos de células de Sertoli (setas). Fig. 22. Detalhe da espermatogônia primária, note a presença de uma substância amorfa (\*) que

agrupa as mitocôndrias próximas ao poro nuclear (seta). Fig. 23. Grupo de espermatogônias secundárias envoltas por prolongamentos citoplasmáticos de células de Sertoli, a cabeça de seta indica uma ponte citoplasmática. Fig. 24. Espermatócitos em zigóteno. Note a presença do elemento lateral do complexo sinaptonêmico (seta). Fig. 25. Corte de cistos contendo espermatócitos primários em prófase (EPP). Note que os processos citoplasmáticos das células de Sertoli envolvem os espermatócitos primários e os separam da secreção presente na luz do túbulo (LT). Fig. 26. Espermatócitos primários em metáfase (EPM). Fig. 27. Espermátide (Ed) e espermatocóide (Ez) imersos na secreção. Note que estas células apresentam diferentes diâmetros nucleares e diferentes estágios de condensação da cromatina. Fig. 28. Espermatozóide imerso na secreção. Note a presença do canal citoplasmático (seta) e um único flagelo. São evidenciadas gotículas lipídicas (L) na secreção.

Na porção secretora do testículo de *A. altiparanae*, as células de revestimento mostraram uma grande quantidade de organelas envolvidas na secreção de lipídios e proteínas. As células secretoras prismáticas mostraram citoplasma cheio de gotas de lipídios, retículo endoplasmático liso próximo às mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e vacúolos (Fig. 29 e 30). A superfície apical estava livre de organelas e algumas vezes apareciam algumas porções que aparentemente se desprendiam de tais células (Fig. 31). Na superfície apical lateral, estas células possuíam junções oclusivas e desmossomos (Fig. 32). Os espaços intercelulares localizados após as junções oclusivas em direção à luz do ducto estavam preenchidos por material semelhante à secreção, também encontrada na luz do túbulo seminífero (Fig. 32).

Os compartimentos intersticiais mostravam uma grande quantidade de fibras de colágeno (Fig. 33), e as células peritubulares mostravam alguns prolongamentos citoplasmáticos, os quais foram responsáveis por formar uma linha irregular sob a lâmina basal (Fig. 34).



Figuras 29 a 34. Cortes de testículo de *A. altiparanae* analisados por microscopia eletrônica de transmissão. Fig. 29. Epitélio secretor e compartimento intersticial (CI) do testículo de lambari. No citoplasma das células secretoras encontra-se uma grande quantidade de gotículas lipídicas e vacúolos, a seta indica o núcleo de uma célula mióide peritubular. A luz do túbulo (LT) contém secreção. Fig. 30. Detalhe do citoplasma de uma célula secretora que mostra mitocôndria, retículo endoplasmático liso (setas) e gotículas lipídicas (L). Fig. 31. Detalhe da superfície apical da célula secretora. Note a ausência de organelas no ápice e pequenas porções sendo liberadas na superfície (setas). Fig. 32. Detalhe da membrana lateral das células secretoras. Note a presença de junção oclusiva (seta) e desmossomos (cabeça de seta). Fig. 33. Corte evidenciando a região basal das células secretoras (CS), lâmina basal (seta), célula mióide peritubular (CMP) e fibrilas colágenas (FC). Fig. 34. Detalhe da célula mióide peritubular (CMP). Note que estas células possuem projeções citoplasmáticas, acompanhadas pela lâmina basal (setas).

A microscopia eletrônica de varredura revelou alguns detalhes de superfícies no testículo de *A. altiparanae*. Durante a maturação inicial a superfície externa do testículo de lambari mostrou algumas projeções arredondadas (Fig. 35), e nenhuma célula livre foi encontrada na luz do túbulo (Fig. 36). Testículos em maturação final apresentavam a luz do túbulo repleta de espermátides imersas em secreção (Fig. 37 e 38). No epitélio germinativo foram encontrados cistos contendo células flageladas (Fig. 39).



Figuras 35 a 39. Eletronmicrografias de varredura de testículos de *A. altiparanae*. Fig. 35. Superfície externa de um testículo em maturação inicial. Fig. 36. Superfície interna de um testículo em maturação inicial, com a luz do túbulo (LT) seminífero vazia, sem células e sem secreção. Fig. 37. Superfície interna de um testículo em maturação final, mostrando o epitélio germinativo (EpG) e a células imersas na secreção presentes na luz do túbulo seminífero (LT). Fig. 38. Epitélio secretor (ES) e luz do túbulo seminífero preenchida com secreção (Se) e espermátides (Ed). Fig. 39. Espermátides flageladas no interior de cistos (seta).

### 5.6 REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

### 5.6.1 RECEPTOR DE ANDRÓGENO

Regiões do testículo nos estádios de maturação inicial, média e final apresentavam marcação tanto no interstício quanto no epitélio germinativo (Fig. 40). As espermatogônias apresentavam pouca marcação difusa pelo citoplasma e, na periferia nuclear, foram encontradas marcações puntiformes bastante proeminentes (Fig. 41). As células da linhagem germinativa apareciam marcadas nos estágios iniciais, diminuindo a positividade na medida em que atingiam os estádios finais de diferenciação. Portanto, as espermatogônias secundárias apresentavam maior positividade quando comparados aos espermatócitos e espermátides (Fig. 41 e 42). No interstício, as células mióides peritubulares apresentavam-se fortemente marcadas (Fig. 43).



Figuras 40 a 43. Cortes do testículo de *A. altiparanae* submetidos à reação imuno-histoquímica contra receptor de andrógeno. As fotomicrografias 40, e 43 são referentes a reações de

imunoperoxidase, enquanto as micrografias 41 e 42 se referem a reações de imunofluorescência. Fig. 40. Células do interstício e células do epitélio germinativo apresentam positividade a esta reação, caracterizada pela coloração castanha. Fig. 41. Fotomicrografia obtida a partir do microscópio confocal a laser. Os retângulos nas porções superior e lateral direita da figura se referem à análise do eixo Z. Tal análise permite afirmar que a marcação contra receptor de andrógeno (verde), na espermatogônia apontada pela seta branca, estava localizada na periferia nuclear. Os núcleos aparecem na cor vermelha. Espermatogônias secundárias também se apresentaram positivas a esta marcação (cabeça de seta). Figura 42. Fotomicrografia de fluorescência mostrando espermatogônias primárias (cabeças de seta), cistos de espermatogônias secundárias (\*) e células mióides peritubulares (setas) positivas à reação contra receptor de andrógeno (verde). Os núcleos aparecem na cor vermelha. Fig. 43. Detalhe de uma região com células mióides peritubulares (setas) positivas a esta reação.

#### 5.6.2 CLAUDINA-1

As células de Sertoli de *A. altiparanae* foram positivas à reação imunohistoquímica contra claudina-1, tendo sido possível visualizar marcação perifericamente aos cistos de espermatogônias e cistos de espermatócitos e espermátides (Fig. 44).

As células que revestiam os ductos apresentavam marcação tanto na superfície basolateral quanto na superfície apical. Esta marcação se distribuía ao longo do limite celular (Fig. 45). Não foi detectada marcação nas células do tecido conjuntivo intersticial.



Figuras 44 e 45. Corte de testículo de *A. altiparanae* submetido à reação de imuno-peroxidase contra claudina-1. As fotomicrografias 44 e 45 são referentes a reações de imunoperoxidase. Fig. 44. As células de Sertoli que envolvem os cistos são positivas a esta reação (setas). Fig 45. As células secretoras são positivas a esta reação (setas). LT – luz do túbulo.

5.6.3 COMPONENTES DO CITOESQUELETO

## 5.6.3.1. CITOQUERATINA

A análise da imunomarcação contra citoqueratina em testículos de lambari revelou que as células de Sertoli apresentavam esta proteína do citoesqueleto independentemente da fase de espermatogênese em que os cistos se encontravam. Desta forma, foi possível visualizar o limite dos cistos (Fig. 46).

Algumas células do tecido intersticial também foram positivas a esta reação, sendo que na maioria das vezes, tais células estavam adjacentes à membrana basal (Figs. 46 e 47). As células endoteliais também se apresentavam marcadas (Fig. 47).

As células epiteliais que revestiam os ductos apresentavam positividade à reação imuno-histoquímica para a citoqueratina, sendo a porção apical a que estava mais marcada (Fig. 47).





Figuras 46 e 47. Reação imuno-histoquímica de fluorescência contra citoqueratina em testículos de *A. altiparanae*. A marcação aparece em verde e os núcleos estão em vermelho. Fig. 46. Os prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (seta fina) são positivos a esta reação, e desta forma, pode ser visualizado o contorno dos cistos. O interstício apresenta marcação nas células mióides peritubulares (seta larga). Fig. 47. As células secretoras colunares (seta) são positivas a essa reação, destacandose as superfícies apical e lateral superior. No interstício, além da marcação nas células mióides peritubulares, também pode ser vista marcação em células endoteliais (cabeça de seta).

## 5.6.3.2 <u>Actina</u>

A reação imuno-histoquímica contra actina revelou que os prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli que envolviam as espermatogônias e cistos contendo espermatócitos ou espermátides continham esta molécula (Fig. 48 e 49).

Nas células epiteliais que revestiam os ductos verificou-se positividade a esta reação nas superfícies apicais, sendo também encontrada marcação de menor intensidade nas superfícies basais e laterais (Fig. 50). Em células epiteliais secretoras prismáticas, frequentemente foram visualizadas marcações em forma de gota na superfície apical (Fig. 50). Houve também marcação periférica aos túbulos seminíferos, no interstício (Fig. 51).



Figuras 48 a 51. Detecção imuno-histoquímica de actina em testículos de *A. altiparanae*. As figuras 48, 49 e 51 são referentes à reação de imunoperoxidase e a marcação aparece na cor marrom. A figura 50 refere-se à reação de imunofluorescência, a marcação aparece em verde e os núcleos em vermelho. Fig. 48. As setas indicam marcação nos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli que envolvem espermatogônias. Fig. 49. Os prolongamentos citoplasmáticos da espermatogênese foram positivos a esta reação. Fig. 50. As células secretoras são positivas a esta reação. Note uma marcação esférica (seta) na superfície apical destas células. Fig. 51. As setas indicam marcações periféricas ao túbulo seminífero.

5.6.4 COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR

## 5.6.4.1 COLÁGENO DO TIPO I

O tecido intersticial foi positivo à imunomarcação contra colágeno do tipo I em todos os estádios do ciclo gonadal.

Nos estádios de maturação inicial, média e final o colágeno do tipo I foi detectado no tecido intersticial, sendo que a marcação apareceu como finas trabéculas ao redor dos túbulos seminíferos, separando-os (Fig. 52). Também foi detectada a presença desta molécula no tecido intersticial da região secretora (Fig. 53).

Na fase de regressão a marcação foi difusa através do interstício, e desta forma, não foi possível visualizar o contorno dos túbulos seminíferos (Fig. 54).



Figuras 52 a 54. Cortes de testículos de A. altiparanae submetidos à reação de imunofluorescência contra colágeno do tipo I. A marcação aparece em verde e os núcleos em vermelho. Figs. 52 e 53. O interstício (setas) tanto da porção espermatogênica (fig. 52) como da porção secretora (Fig. 53) foi positivo a esta reação. Fig. 54. O interstício de testículos em fase de regressão apresentou-se marcado pela detecção imuno-histoquímica desta molécula. Note que, diferentemente do apresentado pelas duas figuras anteriores, os túbulos seminíferos não estão bem delimitados.

### 5.6.4.2 LAMININA

Durante os estádios de maturação, a região da membrana basal do epitélio germinativo foi positiva à marcação contra laminina (Fig. 55).

Também se apresentaram positivas a esta marcação as membranas basais do epitélio secretor e do endotélio (Fig. 56).



Figuras 55 e 56. Detecção imuno-histoquímica de laminina em testículos de *A. altiparanae*. Tanto na região espermatogênica (Fig. 55), como na região secretora (Fig. 56) a marcação pode ser visualizada no interstício (setas), na região da membrana basal. Note a presença de marcação ao redor do endotélio (cabeças de seta) na figura 56.

## 5.6.4.3 FIBRONECTINA

O tecido intersticial, tanto da região espermatogênica (Fig. 57) como da região secretora (Fig. 58), foi positivo à marcação contra fibronectina.

Os cistos contendo espermatogônias ou espermatócitos foram negativos a esta reação; no entanto, o interior de alguns cistos contendo espermátides foi positivo à detecção imuno-histoquímica de fibronectina. Quando positivos, tais cistos apresentavam a marcação em sua periferia, como demonstrado na figura 59.



Figuras 58 e 59. Detecção imuno-histoquímica de fibronectina em testículos de *A. altiparanae*. Fig. 57. As setas indicam a marcação no interstício da porção espermatogênica.Fig. 58. O interstício da porção secretora foi positivo a esta marcação (seta). Fig. 59. Cisto marcado pela detecção de fibronectina (seta), note a presença da marcação somente em um dos lados no interior do cisto.

As figuras 60 a 68 são referentes aos controles negativos das reações imunohistoquímicas aqui apresentadas.



60. Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra receptor de andrógeno. Fig. 61 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra receptor de andrógeno. Fig. 62 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra claudina-1. Fig. 63 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra citoqueratina. Fig. 64 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra actina. Fig. 65 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra actina. Fig. 65 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra actina. Fig. 66 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra actina. Fig. 66 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de fluorescência contra colágeno do tipo I. Fig. 67 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra laminina. Fig. 68 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra laminina. Fig. 68 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra laminina. Fig. 68 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra laminina. Fig. 68 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra laminina. Fig. 68 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra laminina. Fig. 68 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra laminina. Fig. 68 - Controle negativo da reação imuno-histoquímica de peroxidase contra fibronectina.

#### 5.7 OCORRÊNCIA DE INTERSEXO

Através de análises estruturais e ultraestruturais, foi possível observar a presença de folículos ovarianos de diferentes diâmetros no interior dos testículos de alguns indivíduos (Fig. 69 a 72). Quando analisados por microscopia de luz, tais folículos apresentaram aspectos anormais, sendo que a grande maioria continha uma camada amorfa que, em cortes corados com HE era metacromática, aparecendo na cor amarela. Outro aspecto relevante é que a maioria destes

folículos não continha conteúdo nuclear, e também não apresentava a basofilia citoplasmática característica de oócitos pré-vitelogênicos (Fig. 69). Poucos foram os oócitos vitelogênicos encontrados, e ainda assim, aparentemente não apresentavam conteúdo nuclear normal (cromatina e nucléolo) (Fig. 70). Através da utilização do microscópio eletrônico de varredura, também foi revelada a presença de oócitos imersos na secreção e envoltos por espermátides e epermatozóides (Fig. 71 e 72).



Figuras 69 e 70. Cortes de testículos de *A. altiparanae*, corados com HE. Fig. 69. Oócito de aparência anormal, sem conteúdo nuclear. Note a presença de uma camada amorfa que, através de metacromasia, aparece em amarelo (seta). Fig. 70. Oócito vitelogênico circundado por células imersas em secreção na luz do túbulo.

Figuras 71 e 72. Eletronmicrografias de varredura de testículos de *A. altiparanae*. Fig. 71. Oócito (Oc) presente na luz do túbulo, recoberto de espermatozóides e imersos na secreção contendo espermátides. Fig. 72. Oócitos presentes no interior do testículo de *A. altiparanae*, envoltos por espermatozóides.

Dos 93 animais analisados, 16,12% apresentaram oócitos. A figura 73 mostra a distribuição de intersexo ao longo dos meses de coleta. A maior porcentagem de intersexo ocorreu na coleta do mês de fevereiro de 2008, sendo que 45% dos animais coletados apresentaram oócitos anormais no testículo, seguida pelo mês de dezembro de 2007, onde a porcentagem de intersexo foi de 26,6%.



Figura 73. Ocorrência do intersexo por coleta no testículo de A. altiparanae.

# 6 DISCUSSÃO

Apesar da semelhança da estrutura testicular com outros teleósteos, o testículo de *Astyanax altiparanae* é interessante por poder apresentar vários estádios do ciclo reprodutivo em um único exemplar. Áreas ocupadas pelo epitélio germinativo são responsáveis pela produção de espermatozóides e, após a liberação das células da linhagem germinativa dos cistos, as células de Sertoli adquirem uma função secretora que será discutida abaixo.

Ao mesmo tempo, foi demonstrado neste trabalho, pelas análises morfométricas, que esta espécie apresenta uma variação cíclica bastante acentuada dos estádios gonadais em machos. Os coeficientes de variação apresentados pelas tabelas 1 a 5, revelaram que para cada um dos estádios existe pelo menos um parâmetro considerado razoável ou aceitável, o que indica que a análise morfométrica apresentada é válida para caracterizar os estádios do ciclo gonadal.

A análise dos dados de cada um dos parâmetros agrupados em blocos casualizados, revelou que dentre os parâmetros utilizados, os parâmetros "interstício", "luz com células" e "epitélio germinativo" são os mais confiáveis por apresentarem os menores coeficientes de variação. A análise dos dados desses três parâmetros permite inferir de forma quantitativa as alterações morfológicas que o testículo de *A. altiparanae* apresenta ao longo do ciclo gonadal.

Os dados apresentados para o parâmetro "interstício" mostra uma clara tendência de diminuição do espaço ocupado pelo interstício durante os estádios de maturação inicial, média e final, fato que pode ser confirmado através de comparações entre as figuras 10, 11, 12, 13 e 14.

O aumento da área ocupada pelo parâmetro "luz com células" no estádio de maturação final, apresentado pela tabela 7, pode ser facilmente visualizado na figura 12, especialmente quando a mesma é comparada com as demais figuras que apresentam os estádios do ciclo gonadal (Figs. 10, 11, 13 e 14).

Por sua vez o parâmetro "cistos de espermatogônias e espermátides" apresentou a maior média durante o estádio de maturação inicial, fato que pode ser corroborado com a análise da figura 10.

Apesar dos elevados coeficientes de variação, os parâmetros "espermatogônias", "epitélio de ducto" e "luz sem células" também foram capazes de demonstrar diferenças estatísticas entre os estádios do ciclo gonadal. Além disso, a análise morfométrica aqui apresentada associada ao estudo morfológico comprovou que as regiões caudal, mediana e cefálica de um testículo de lambari, assim como as regiões dorsal e ventral deste órgão, podem apresentar diferentes estádios do ciclo gonadal.

Nos mamíferos, é bastante conhecida a onda espermatogênica do túbulo seminífero, sendo que a de ratos foi descrita já na década de 60 por Perey et al. (1961). Devido ao fato da maioria dos mamíferos possuir espermatogênese contínua, no testículo destes animais pode ser observada uma onda em espiral de espermatogênese que ajuda a manter o diâmetro constante dos túbulos seminíferos, e evita a obliteração da luz do túbulo caso haja uma grande produção localizada de espermatozóides (ver revisão em Hermo et al., 2010).

Para o lambari, a manutenção de regiões do testículo em diferentes estádios do ciclo pode contribuir para que o animal possa produzir espermatozóides e possua reservas deste gameta no interior do testículo quase o ano todo, ou ainda, permite que o animal realize liberação parcelada dos espermatozóides, provavelmente em concordância com condições ambientais mais favoráveis.

Machos de *A. altiparanae* mantém espermatozóides imaturos imersos na secreção encontrada na luz do túbulo, supostamente deixando o animal preparado para a atividade reprodutiva durante grande parte do ano. No entanto, no inverno, foram encontrados alguns animais apresentando os testículos unicamente no estádio de regressão. Isto sugere que o testículo de lambari, no final do ciclo reprodutivo, requer uma remodelação tecidual completa. De fato, foi demonstrado no presente trabalho que, no estádio de regressão, houve uma remodelação expressiva nos testículos, a ponto de aumentar o tecido intersticial (Fig. 15) e quase não se distinguir o epitélio germinativo do compartimento intersticial (Figs. 13 e 54).

As células que revestem os ductos do testículo de *A. altiparanae* provavelmente surgem em função da conhecida plasticidade das células de Sertoli (GRIER, 1993) que devem adquirir a função adicional de célula secretora. Depois da liberação das células germinativas, sugerimos que, nesta espécie, a célula de Sertoli altere sua forma e adquira a função de secreção, ao mesmo tempo em que se torna responsável por formar o revestimento dos ductos testiculares. Estes eventos podem explicar a variação da posição dos ductos testiculares quando diferentes animais são comparados, provavelmente porque todo o rearranjo necessário seja regido de acordo com um equilíbrio próprio do indivíduo naquele momento.

De acordo com Grier (1993), em alguns condrichthies as células de Sertoli possuem bipotencialidade, e o sistema de ductos do testículo destes animais poderia ser resultado da aquisição de outra função das células de Sertoli que passam a revestir o ducto espermático. Este autor sugere que se a célula de Sertoli está em contato com uma espermatogônia, ela adquire a função de suporte e forma os cistos, mas se estas células não estão em contato com as células germinativas, elas desenvolvem a função de revestimento e tornam-se responsáveis por revestir os ductos testiculares. A hipertrofia da célula de Sertoli e aquisição de atividade secretora também foram descritas em duas espécies do gênero *Scorpaena* por Sàbat et al. (2009).

O controle genético das alterações das funções desempenhadas pelas células de Sertoli permanece desconhecido, sendo as células de *A. altiparanae* um possível modelo de estudo de plasticidade funcional de células diferenciadas em vertebrados não-mamíferos.

O presente estudo ultraestrutural das células secretoras do testículo de *A. altiparanae* revelou que estas células estão envolvidas na secreção de lipídios e proteínas. Embora a constituição química da secreção presente no testículo de lambari não seja completamente conhecida, neste trabalho, além das gotículas de lipídios reveladas pela microscopia eletrônica de transmissão, foi visto, através de microscopia de luz, que estas células são negativas ao PAS e AB, o que indica a ausência de polissacarídeos neutros e ácidos, respectivamente.

A presença de células na luz do túbulo com diferentes tamanhos e diferentes padrões de condensação da cromatina, sugere que a espermatogênese de *A. altiparanae* seja semicística, ou seja, a finalização da espermiogênese ocorre na luz do túbulo e não no interior dos cistos (Mattei et al., 1993). Desta forma, a secreção encontrada na luz do túbulo, além de desempenhar a função de manutenção das células imersas nesta secreção, poderia prover fatores que controlam a espermiogênese.

Sàbat et al. (2009) demonstraram que as espécies de *Scorpaena porcus* e *Scorpaena scrofa* possuem espermatogênese semicística, sendo encontradas espermátides no lúmen e que, portanto, não possuem conexões com as células de Sertoli. Tais autores sugerem que a atividade secretora das células de Sertoli hipertrofiadas destas espécies pode estar relacionada ao processo de transferência de metabólitos entre as células de Sertoli e as espermátides que estão no lúmen.

Têm sido descrito que a  $17\alpha$ ,  $20\beta$  diidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) está relacionada à maturação do espermatozóide (Ghosh e Thomas, 1995; Thomas et al., 1997; Miura e Miura, 2003). A DHP atua diretamente sobre o espermatozóide ativando a anidrase carbônica. Esta ativação enzimática causa um aumento no pH do líquido seminal e o espermatozóide adquire habilidade motora (Miura et al., 1991a; Miura et al., 1991b; Miura e Miura, 2003). Assim, sugere-se que a secreção encontrada no testículo de *A. altiparanae* poderia participar também do processo de controle da ativação do espermatozóide, através da presença de fatores de ativação autócrinos ou parácrinos, supostamente fornecidos pela célula secretora.

As mitocôndrias são importantes organelas envolvidas na síntese de esteróides, uma vez que contém a enzima *P450 scc* (do inglês, *side-chain cleavage*) responsável por converter colesterol em pregnenolona (Miller, 2002). Embora a presença desta enzima não tenha sido ainda investigada no testículo de *A. altiparanae*, a figura 30 mostra a proximidade de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e gotículas lipídicas no interior de células secretoras, o que pode indicar atividade de síntese de esteróides por estas células. Este fato corrobora o suposto controle da espermiogênese por um fator parácrino ou autócrino, como acima mencionado.

No presente trabalho, foi demonstrada a presença de receptor de andrógeno nas espermatogônias e nas células mióides peritubulares. Waal et al. (2008) investigaram a presença de andrógenos em *Danio rerio*, e identificaram 11 β-hydroxyandrostenediona, 11-cetoandrostenediona e 11-cetotestosterona como principais produtos, sendo todos ligantes potenciais para o receptor de andrógeno daquela espécie. Diferentemente dos resultados aqui apresentados, tais autores mostraram, através de hibridação *in situ*, presença de receptor de andrógeno somente em células de Sertoli em contato com espermatogônias primárias.

Em geral, o receptor de andrógeno pode ser encontrado no citoplasma ou no interior do núcleo. Quando este receptor não está acoplado ao seu ligante, ele é encontrado no citoplasma, mas quando acoplado ao ligante, se torna fosforilado e, após dimerização, é translocado para o núcleo onde atua como fator de transcrição de genes alvos (revisão em Li e Al-Azzawii, 2009).

Explantes de testículos imaturos de *Anguilla japonica*, contendo somente espermatogônias, cultivados em meio contendo 11-cetotestosterona, apresentaram espermatogênese completa (Miura et al., 1991a). Estes resultados indicam que a 11-

cetotestosterona é um dos hormônios envolvidos na proliferação comprometida com a meiose (revisão em Schulz, 2009). No entanto, acredita-se que a ação da 11cetotestosterona é mediada por outros fatores produzidos pelas células de Sertoli as quais, segundo Ikeuchi et al. (2001), expressam receptor de andrógeno. Para *A. altiparanae*, sugerimos que quando a espermatogônia apresenta marcação citoplasmática contra receptor de andrógeno, não há ligante acoplado a este receptor, e que, portanto, esta célula pode estar comprometida com a proliferação e não com a diferenciação para espermatócitos.

Recentemente, Nóbrega et al. (2010) demonstraram que as células tronco de espermatogônias do testículo de *Danio rerio* são encontradas em locais denominados nichos, que se situam na base do epitélio germinativo, próximos a regiões do interstício contendo vasos sanguíneos.

Zhang et al. (2007) sugeriram que a localização dos nichos de espermatogônias tronco de roedores na base do epitélio germinativo está relacionada a maior concentração de andrógenos, o que estimula o estado indiferenciado dessas células. No entanto, já foi demonstrado que a 11-cetotestosterona é capaz de induzir espermatogênese em tecidos de testículos de *Danio rerio* (Leal et al., 2009). Dessa forma, Nóbrega et al. (2010) sugeriram que a proximidade das espermatogônias tronco do testículo de *Danio rerio* com vasos sanguíneos pode indicar uma interferência de células endoteliais no comportamento de espermatogônias tronco.

Outro aspecto importante sobre a detecção de receptor de andrógeno é o fato de que a marcação foi coincidente com a localização das nuages das espermatogônias. As nuages, também conhecidas como corpos germinais densos, aparecem como um material polimórfico osmiofílico, livre ou associado às mitocôndrias. no citoplasma das espermatogônias de muitos teleósteos. Frequentemente, as nuages estão localizadas na periferia do envoltório nuclear, próximas aos poros nucleares (Schulz et al., 2009; Lo Nostro et al., 2003). As nuages contém ribonucleoproteínas e RNAs de meia vida de longa duração, incluindo, por exemplo, RNAm de vasa, um produto específico das células da linhagem germinativa (Quagio-Grassioto e Carvalho, 1999; Braat et al., 1999). Assim, as *nuages* podem ser o sítio de localização citoplasmática do receptor de andrógeno nas espermatogônias e a localização preferencial destas estruturas, próximas ao poro nuclear, poderia facilitar a translocação do complexo receptor de
andrógeno-ligante para o interior do núcleo. No entanto, a localização exata de marcação nas espermatogônias só poderá ser confirmada com estudos imunocitoquímicos, utilizando métodos de imunomarcação com ouro coloidal, ou hibridização *in situ*.

Ikeuchi et al. (2001) demonstraram que receptor de andrógeno foi expresso em células intersticiais do testículo de teleósteos, indicando que os andrógenos também atuam nestas células. No presente trabalho, as células mióides peritubulares foram positivas à marcação imuno-histoquímica contra receptor de andrógeno. É bastante conhecido que os andrógenos atuam sobre as células mióides peritubulares dos vertebrados mais derivados, tais como os mamíferos (Schulz et al., 2009), e é interessante ressaltar que as células mióides peritubulares do testículo dos teleósteos possuem características de células contráteis. Eletronmicrografias de transmissão revelaram, no presente trabalho, projeções citoplasmáticas de células mióides peritubulares em direção às células secretoras, as quais podem ser resultantes da atividade contrátil destas células.

Park et al. (2011) demonstraram que células de Sertoli de *Phasianus colchicus* em cultivo aumentaram a expressão de RNAm de receptor de andrógeno e de claudina-1 quando testosterona foi adicionada ao meio de cultivo. Tais autores sugeriram uma relação entre a presença de testosterona e o estabelecimento da barreira hematotesticular, constituída de junções oclusivas.

No presente trabalho, a detecção de claudina-1 sugere a existência de junções oclusivas entre células de Sertoli adjacentes, podendo contribuir para formar a barreira hematotesticular. Batlouni et al. (2005) demonstraram a presença de junções oclusivas entre as células de Sertoli de *Pseudoplatystoma fasciatum*.

A proteína claudina-1 também foi encontrada em células secretoras; ao mesmo tempo, o estudo ultraestrutural aqui apresentado revelou a presença de junções oclusivas e desmossomos entre tais células. Sàbat et al. (2009) sugerem que a presença de junções oclusivas entre as células de Sertoli hipertrofiadas de *Scorpaena porcus* e de *Scorpaena scrofa* pode ajudar a evitar o surgimento de anticorpos anti-espermatozóides, além de fornecer um ambiente seguro onde as células germinativas masculinas haplóides podem finalizar o processo de diferenciação.

Neste trabalho, citoqueratina foi encontrada nas células de Sertoli de A. altiparanae. Nos mamíferos, as células de Sertoli apresentam filamentos

intermediários constituídos principalmente por vimentina (Vogl et al., 1970). No entanto, para peixes, os filamentos intermediários das células de Sertoli parecem variar de acordo com a espécie. Arenas et al. (1995) mostraram que no peixe mosquito (*Gambusia affinis holbrooki*) estas células são negativas à reação imuno-histoquímica contra vimentina ou citoqueratina. Por outro lado, em concordância com o aqui apresentado para *A. altiparanae*, Batlouni et al. (2005) demonstraram que na espécie *Pseudoplatystoma fasciatum* as células de Sertoli apresentam citoqueratina.

Pfeifer e Vogl (2002) revelaram que na porção apical das células de Sertoli de lampréia (*L. tridentatus*) e peixe-bruxa (*E. stouti*) existem junções parecidas com as zônulas de adesão e que se associam aos filamentos de actina.

No presente trabalho, a actina foi detectada tanto nas células de Sertoli como nas células secretoras, no entanto, o padrão da marcação foi diferente. Nas células de Sertoli a marcação foi encontrada ao longo dos prolongamentos citoplasmáticos que envolviam os cistos. Provavelmente, esses filamentos estão relacionados tanto com o estabelecimento de junções como na sustentação destes prolongamentos citoplasmáticos que dão suporte às células germinativas. Por outro lado, nas células secretoras, a actina foi identificada na periferia celular, provavelmente participando da constituição de junções intercelulares presentes na região de trama terminal. A marcação esférica apical encontrada nas células secretoras necessárias para o desprendimento da porção apical da célula durante a secreção apócrina.

A matriz extracelular é conhecida pela função de fornecer suporte estrutural para órgãos e tecidos, especialmente para o tecido epitelial, onde a matriz se organiza na forma de membrana basal, e para células individuais servindo de substrato durante a migração celular (Hynes, 2009).

Estudos *in vitro* mostram que a morfologia, o comportamento e a função das células de Sertoli de mamíferos são fortemente influenciados pelo substrato sobre o qual estão plaqueadas (Tung e Fritz, 1984). Em testículos de camundongos, a base das células de Sertoli está em contato com componentes da membrana basal, composta principalmente por laminina, colágeno do tipo IV e heparan sulfato (Hadley e Dym, 1987).

Apesar da grande importância da matriz extracelular sobre o comportamento de células e tecidos, poucos foram os trabalhos encontrados que descrevem o

comportamento da matriz extracelular em tecidos e órgãos de peixes. Dessa forma, o estudo da expressão das moléculas da matriz extracelular pode contribuir para o entendimento da biologia desse órgão.

As diferenças aqui apresentadas de distribuição do colágeno do tipo I em testículos de *A. altiparanae* em maturação e em regressão sugerem que, durante este último estádio, o testículo apresenta uma grande remodelação de seus tecidos, onde a área ocupada pelo interstício aumenta e passa a ocupar um volume maior.

A matriz extracelular é crucial para prover um ambiente para a migração, divisão, diferenciação, ancoragem, sobrevivência e morte das células de um tecido (Chavez-Pozo et al., 2008). Assim, as diferentes organizações das fibras de colágeno do tipo I no interstício do testículo de *A. altiparanae* provavelmente refletem a remodelação tecidual que deve ser necessária para o estabelecimento de um novo ciclo gonadal.

As metaloproteinases possuem grande função durante a remodelação de tecidos, incluindo fusão de membranas, liberação de fatores de crescimento e citocinas, e migração celular (Shah e Catt, 2004). Chavez-Pozo et al. (2008) demonstraram que testículos em repouso de *Sparus aurata* apresentam uma população de granulócitos acidófilos responsáveis por produzir as metaloproteinases 2 e 9. Tais autores sugerem que tais enzimas sejam necessárias para a remodelação testicular observada naquele estádio do ciclo. O posterior estudo da expressão de metaloproteinases no testículo de *A. altiparanae* pode contribuir para o entendimento do comportamento da matriz extracelular deste órgão.

No presente trabalho foi demonstrado que a membrana basal do testículo de *A. altiparanae*, responsável por separar os compartimentos germinativo e intersticial, possui laminina na sua constituição. Lustig et al. (2000) demonstraram que a imunização passiva com imunoglobulina G anti-laminina modifica a integridade do epitélio seminífero de porcos da índia. A desorganização dos túbulos seminíferos de *A. altiparanae*, visualizada durante o estádio de regressão, deve refletir possíveis alterações na disposição da laminina da membrana basal do epitélio germinativo.

A produção e secreção de fibronectina por células mióides peritubulares é bastante conhecida para os mamíferos (Tung e Fritz, 1984). Também foi demonstrado por Morales et al. (2004) que os testículos de hamsters idosos possuem maior quantidade de fibronectina quando comparados aos de animais mais jovens. Apesar da distância filogenética existente entre peixes e mamíferos,

sugerimos que a fibronectina encontrada no interstício de *A. altiparanae*, pode ser secretada pelas células mióides peritubulares, uma vez que tal marcação estava localizada perifericamente ao túbulo seminífero.

Apesar de não ser encontrado nenhum outro trabalho na literatura consultada que também demonstre a presença de fibronectina no interior dos cistos germinativos de peixes, propomos que a marcação destas regiões, aqui apresentada, seja fruto de uma detecção específica de fibronectina, já que tal padrão de marcação se mostrou constante. A função da fibronectina no interior dos cistos permanece não elucidada, no entanto, pode-se sugerir que a presença desta molécula esteja envolvida nos processos finais de diferenciação das espermátides, visto que tal marcação só aparece em cistos contendo tais células. Ou ainda, a presença desta molécula poderia estar relacionada ao estabelecimento de diferentes polos no interior dos cistos.

No presente trabalho foi detectado um grupo de indivíduos cujos testículos apresentavam oócitos e, portanto, estes animais foram classificados como intersexo. Este fato pode estimular grande interesse de pesquisadores a respeito desta espécie. Embora eletronmicrografias de varredura tenham revelado oócitos circundados por espermatozóides, estudos complementares utilizando a microscopia de luz revelaram que os oócitos presentes no testículo não possuíam características de oócitos normais, tais como a basofilia citoplasmática típica de oócitos prévitelogênicos. Estes resultados revelaram que os animais classificados como intersexo não possuem a capacidade de reproduzir através das células da linhagem germinativa feminina presentes em seus testículos.

Também é conhecido que a exposição de peixes a poluentes pode estimular o desenvolvimento do intersexo (Mills e Chichester, 2005). O fenômeno do intersexo levou muitos autores a dedicar seus esforços no estudo desta situação anormal de espécies gonocorísticas de peixes (Hinck et al., 2009; Kiparissis et al., 2003; Metcalfe et al., 2000; Jobling et al., 1998). Hinck et al. (2009) descreveram a ocorrência do intersexo em machos de *Micropterus spp.*, um gênero nativo das águas do continente Norte Americano. Tais autores encontraram 18% de machos *Micropterus salmoides* que desenvolveram o intersexo, enquanto a taxa para machos *Micropterus dolomieu* foi de 33%. No entanto, segundo estes autores, a taxa da ocorrência de intersexo pode ter sido subestimada devido à análise de somente uma pequena porção das gônadas destes animais.

No presente trabalho, a análise morfológica dos testículos de *A. altiparanae* tinha como objetivo inicial a descrição dos estádios do ciclo gonadal, no entanto, foi detectada a ocorrência de intersexo. A taxa de intersexo obtida pode ter sido subestimada, uma vez que não foi analisada a totalidade das gônadas coletadas no decorrer de todo tempo em que foi desenvolvido este trabalho.

Segundo Hinck et al. (2009), para a avaliação da ocorrência de intersexo em gônadas de peixes, devem ser conduzidos experimentos onde sejam analisados de 5 a 10 cortes por gônada, dependendo do tamanho do animal. Considerando que *A. altiparanae* é um peixe nativo das águas brasileiras, e também levando em consideração o tamanho de sua gônada, onde cortes transversais e longitudinais da totalidade do órgão cabem em uma única lâmina histológica, esta espécie poderia ser considerada como um bioindicador da qualidade de água, e ainda poderia ser usada em estudos ecotoxicológicos que utilizem técnicas histológicas de avaliação.

Devido ao fato da ocorrência do intersexo ter sido encontrada ao longo do nosso experimento e, portanto, não ter sido objetivo inicial de nosso estudo, consideramos que são necessários estudos adicionais que visem a quantificação de tal ocorrência em *A. altiparanae*. Cortes semi-seriados da gônada completa podem ser realizados para este tipo de experimento, pois possibilitam uma análise mais detalhada do órgão.

Segundo Blazer et al. (2007), a maior prevalência de intersexo em machos de *Micropterus dolomieu* ocorre durante o período anterior à liberação dos espermatozóides. No presente trabalho a maior ocorrência de intersexo foi encontrada no mês de fevereiro de 2008, onde os testículos também apresentavam grandes áreas no estádio de maturação final com a luz repleta de células livres. Desta forma, sugere-se que o verão seja a melhor época para a condução de experimentos que visem analisar a ocorrência de intersexo nas gônadas de *A. altiparanae* machos.

## 7 CONCLUSÕES

 Os estudos morfológico, ultraestrutural e imuno-histoquímico possibilitaram evidenciar as alterações teciduais ocorridas no testículo de *A. altiparanae* ao longo do ciclo reprodutivo.

- Os estudos morfológicos utilizados no presente trabalho demonstraram que no testículo de *A. altiparanae* existem duas diferentes regiões funcionais, a espermatogênica e a secretora. Estas regiões podem estar distribuídas tanto no sentido dorso-ventral como antero-posterior.

 Um único testículo desta espécie pode apresentar regiões em diferentes estádios do ciclo gonadal.

- A morfometria utilizada revelou-se um método eficaz para demonstrar as alterações morfológicas do testículo desta espécie ao longo do ciclo gonadal.

 Foi demonstrada a capacidade desta espécie desenvolver intersexo. A porcentagem de indivíduos que apresentou este fenômeno variou ao longo do ano, sendo a maior incidência encontrada no verão.

## REFERÊNCIAS

Almeida RBC. *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação. [Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)] Botucatu: Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2007.

Agostinho CA. Ciclo reprodutivo e primeira maturação de fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*) (L) (Osteichtyes - Characidae) do Rio Ivaí, Estado do Paraná. Revista Brasileira de Biologia. 1984;44:31-6.

Arenas MI, Fraile B, De Miguel M, Paniagua R. Intermediate filaments in testis of the teleost mosquito fish *Gambusis affinis holbrooki*: a light and electron microscope immunocytochemical study and Western Blotting analysis. Histochemical Journal. 1995;27:329-37.

Batlouni SR, Carreño FR, Romagosa E, Borella MI. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatum* (Pisces, Siluriformes). Journal of Molecular Histology. 2005;36:97-110.

Batlouni, S.R.; E. Romagosa, and M.I. Borella. 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. 2006;96:116-32.

Blazer VA, Iwanowicz LR, Iwanowicz DD, Smith DR, Young JA, Hedrick JD, Foster SW, Reeser SJ. Intersex (testicular oocytes) in smallmouth bass from the Potomac River and selected nearby drainages. Journal of Aquatic Animal Health. 2007;19:242–53.

Boekelheide K, Neely MD, Sioussat TM. The Sertoli cell cytoskeleton: a target for toxicant-induced germ cell loss. Toxicology and applied pharmacology. 1989;101:373-89.

Bouma J, Cloud JG. Sertoli cell biology in fishes and amphibians. In: Russel LD. Griswald MD., editors. The Sertoli cell biology. Florida, USA: Cache River Press. Clearwater; 1993. p. 71-80.

Braat AK, Zandbergen T, Water SVD, Goos HJTh, Zivkovic D. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. Developmental Dynamics. 1999;216:153–67.

Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage dependent expression and regulation by androgens. Endocrinology.1994;135:1227–34.

Canteri MG, Althaus RA, Virgens Filho JS, Giglioti EA, Godoy CV. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos

métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. Revista Brasileira de Agrocomputação. 2001;1:18-24.

Cavaco JE, van Blijswijk B, Leatherland JF, Goos HJ, Schulz RW. Androgen-induced changes in Leydig cell ultrastructure and steroidogenesis in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus*. Cell and Tissue Research. 1999;297:291–9.

Cavaco JE, Bogerd J, Goos H, Schulz RW. Testosterone inhibits 11-Ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (Clarias gariepinus). Biology of Reproduction. 2001;65:1807–12.

Chavez-Pozo E, Castillo-Briceño P, García-Alcázar A, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala. A role for matrix metalloproteinases in granulocyte infiltration and testicular remodelation in a seasonal breeding teleost. Molecular Immunology. 2008;45:2820-30.

Cinquetti R, Dramis L. Histological, histochemical, enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padagobius martensi* between annual breeding seasons. Journal of Fish Biology. 2003;63:1402-28.

Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture. 2002;208:191-364.

Dym M, Fawcett DV. The blood testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. Biology of Reproduction. 1970;3:308-26.

Dziewulska K, Domagala J. Histology of salmonid testes during maturation. Biology Reproduction. 2003;3:47-61.

Eigenmann CH. The american characidae. Memoriam Museum Comparative Zoology. 1921;43:227-310.

Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. Journal American Socitety of Nephrology. 1999;10:1337-45.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tusukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding. F. Journal Cell Biology. 1998;141:1539-50.

Garutti V, Britski HA. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Série Zoologia. 2000;13:65-88.

Ghosh S, Thomas P. Binding characteristics of  $20\beta$ -S to Atlantic croaker sperm membrane receptor. In: Goetz FW, Thomas P, editors. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of the Fish, 1995. Austin: University of Texas; 1995. p. 239–45.

Grier HJ. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. American Zoology. 1981;21:345-57.

Grier HJ. Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. The Journal of Experimental Zoology. 1992;261:151-60.

Grier HJ. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cells barrier. In: Russel LD, Griswald MD, editors. The Sertoli cell. Florida, USA: Cache River Press. Clearwater; 1993. p. 704-39.

Grier HJ. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: 53rd annual Gulf and Caribbean fisheries institute; 2002. Proceedings of the 53<sup>rd</sup> annual Gulf and Caribbean fisheries institute; 2002. p. 537-52.

Hadley MA, Dym M. Immunocytochemistry of extracellular matrix in the lamina propria of the rat testis: electron microscopic localization. Biology of Reproduction. 1987;37:1283-9.

Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. Microscopy Research and Technique. 2010;73:243-78.

Hill CM, Anway MD, Zirkin BR, Brown TR. Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat Sertoli cells. Biol Reprod. 2004;71:1348–58.

Hinck JE, Blazer VS, Schmitt CJ, Papoulias DM, Tillitt DE. Widespread occurrence of intersex in black basses (*Micropterus spp.*) from U.S. rivers, 1995-2004. Aquatic Toxicology. 2009;95:60-70.

Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. Science. 2009;27:1216-9.

Hughes IA. Sex differentiation. Endocrinology. 2001;142:3281–7.

Ihering RV; Azevedo P. As piabas dos açudes nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae). Arch Inst Biol 1936; 7:75-106.

Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y. Two subtypes of androgen and progestogen receptors in fish testes. Comparative Biochemistry Physiology. 2001;129B:449–55.

Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science Technology. 1998;32:2498-2506.

Johnston H, Baker PJ, Abel M, Charlton HM, Jackson G, Fleming L, Kumar TR, O'Shaughnessy PJ. Regulation of Sertoli cell number and activity by folliclestimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. Endocrinology. 2004;145:318–29. Kavamoto ET; Narahara MY, Andrade-Talmatelli EF. Mudanças morfológicas dos testículos de curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner) (Teleostei, Prochilodontidae), submetido à indução hormonal. Revista Bras. Zool. 1998;15:109-115.

Kiparissis Y, Metcalfe TL, Balch GC, Metcalfe, CD. Effects of the antiandrogens vinclozin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Aquatic Toxicology. 2003;63:391-403.

Leal MC, de Waal PP, García-Lopez A, Chen SX, Bogerd J, Schulz RW. Zebrafish primary testis tissue culture: An approach to study testis function ex vivo. General Comparative Endocrinology. 2009:162(2):134-8.

Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. Maturitas. 2009;63:142-8.

Lo Nostro FL, Grier H, Meijide FJ, Guerrero GA. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. Tissue Cell. 2003;35:121-32.

Lo Nostro FL, Antoneli FN, Quagio-Grassioto I, Guerrero GA. Testicular interstitial cells, and steroidogenic detection in the protogynous fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). Tissue Cell. 2004;36:221-31.

Lustig L, Denduchis B, Ponzio R, Lauzon M, Pelletier RM. Passive immunization with anti-laminin immunoglobulin G modifies the integrity of the seminiferous epithelium and induces arrest of spermatogenesis in the guinea pig. Biology of Reproduction. 2000;62:1505-14.

Martinez CBR, Cólus IMS. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA. editores. A bacia do rio Tibagi. Londrina: MC Gráfica; 2002. p. 551-77.

Mattei X, Siau YO, Thiam D. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidon* sp (Pisces Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. Journal of Fish Biology. 1993;43:931-7.

Metcalfe TL, Metcalfe CD, Kiparissis Y, Niimi AJ, Foran CM, Benson WH. Gonadal development and endocrine responses in Japanese medaka (*Orozias latipes*) exposed to o,p'-DDT in water or through maternal transfer. Environmental and Toxicological Chemistry. 2000;19:1893-1900.

Miller WL. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. Molecular and Cell Endocrinology. 2002;198:7-14.

Mills LJ, Chichester C. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environmental impacting fish populations?. Science of the Total Environmental. 2005;343:1-34.

Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y. Hormonal induction of all classes of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proc Natl Acad Sci USA. 1991a;88:5774–8.

Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y. Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male eel (*Anguilla japonica*). Biomed Res.1991b;12: 241–8.

Miura T, Miura CI. Molecular control of fish spermatogenesis. Fish Physiol Biochem. 2003;28:181-6.

Morales E, Horn R, Pastor LM, Santamaria L, Parallés J, Zuasti A, Ferrer C, Canteras M. Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. Histology and Histopathology. 2004;19:445-55.

Morrow CMK, Mruk D, Cheng CY, Hess RA. Claudin and occluding expression and function in the seminiferous epithelium. Philosophical Transactions of The .Royal Society B. 2010;365:1679-96.

Nybom P, Magnusson KE. Modulation of the junctional integrity by low or high concentrations of cytochalasin B and dihidrocytochalasin B is associated with distinct changes in F-actin and ZO-1. Bioscience Reproduction. 1996:16:313-26.

Nóbrega RH, Quagio-Grassioto I. Morphofunctional changes in Leydig cells throughout the continuous spermatogenesis of the freshwater teleost fish, *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes, Characidae): an ultrastructural and enzyme study. Cell and Tissue Research. 2007;329:339-49.

Nolan M, Jobling S, Sumpter JP, Tyler CR. A histological description of intersexuality in the roach. Journal of Fish Biology. 2001;58:160-76.

Orsi ML, Carvalho ED, Foresti, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia. 2004;21:207-18.

Pall MK, Mayer I, Borg B. Androgen and behavior in the male three spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* I. Changes in 1-ketotestosterone levels during the nesting cycle. Hormones and Behavior. 2002a;41:377–83.

Pall MK, Mayer I, Borg B. Androgen and behavior in the male three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* II. Castration and 11-ketoandrostenedione effects on courtship and parental care during the nesting cycle. Hormones and Behavior. 2002b;42:337–44.

Park CJ, Lee JE, Oh YS, Shim S, Nah WH, Choi KJ, Gye MC. Expression of claudin-1 and -11 in immature and mature pheasant (*Phasianus colchicus*) testes. Theriogenology. 2011;75:445-58. Perey B, Clermont Y, Leblond CP. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. American Journal of Anatomy. 1961;108:47–77.

Pfeiffer DC, Vogl AW. Actin-Related intercellular adhesion junctions in the germinal compartment of the testis in the hagfish (*Eptatretus stouti*) and lamprey (*Lampetra tridentatus*). Tissue Cell. 2002;34:450-9.

Porto-Foresti F, Castilho-Almeida RB, Foresti F. Biologia e criação do lambari-dorabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldisseroto B, Gomes LC, editores. Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil. Santa Maria: Ed UFSM; 2005. p. 105-20.

Prioli SMAP, Prioli AJ, Junior HFJ, Pavanelli CS, Oliveira AV, Carrer H, Carraro DM, Prioli LM. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. Genetics and Molecular Biology. 2002;25:421:30.

Pudney J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. Microscopy Research. Technique. 1995;32:459-97.

Quagio-Grassiotto I, Carvalho ED. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. Tissue Cell. 1999;31:561–7.

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). 2009;270:662-72.

Santos RA, Campos EC, Camara JJC, Mandelli Júnior J. Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), na represa de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca. 1991;18:1-11.

Santos RN, Andrade CC, Santos LN, Santos AFGN, Araújo FG. Testicular maturation of *Oligosarcus heptus* (Cuvier) (Actinopterigii, Characidae) in a brazilian tropical reservoir. Braz. J. Biol. 2006;66:143-50.

Sato Y, Sampaio EV, Fenerich-Verani N, Verani JR. Biologia reprodutiva de duas espécies de Characidae (Osteichtyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia. 2006;23:267-73.

Shah BH, Catt KJ. Matrix metalloproteinase-dependent EGF receptor activation in hypertension and left ventricular hypertrophy. Trends Endocrinology Metabolism. 2004;15:241-3.

Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD, editors. The physiology of reproduction. 2nd ed. New York: Raven Press. 1994. p. 1363–433.

Sharpe RM. Sertoli cell endocrinology and signal transduction: androgen regulation. In: Griswold M, Skinner M, editors. Sertoli cell biology. San Diego: Academic Press; 2005. p. 199–216.

Schulz RW, França LR, Lareyre JJ, LeGac F, Chiarini-Garcia H, Nóbrega RH, Miura T. Spermatogenesis in fish. General and Comparative Endocrionology. 2010; 165:390-411.

Silva JV, Andrade DV, Okano WY. Desenvolvimento sexual e crescimento de lambaris – tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 submetidos a diferentes tipos de alimentação. Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia. 1996;48:47-54.

Sinha-Hikim AP, Bartke A, Russell LD. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. Biology of Reproduction. 1998;39:1225-37.

Sultan C, Paris F, Terouanne B, Balaguer P, Georget V, Poujol N, Jeandel C, Lumbroso S, Nicolas JC. Disorders linked to insufficient androgen action in male children. Hum Reprod Update. 2001;7:314–22.

Thomas P, Breckenridge-Miller D, Detweiler C. Binding characteristics and regulation of the  $17,20\beta,21$ -trihydroxy-4- pregnen-3-one ( $20\beta$ -S) receptor on testicular and sperm plasma membranes of spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*). Fish Physiol. Biochem. 1997;17:109–16.

Toury R, Clérot JC, André J. Les groupments mitochondriaux des cellules germinales des poissons teleostens cyprinides. Analyses biochimique des constiturants du "ciment" intermitochondrial isolé. Biol Cell. 1977;30:225-32.

Tung PS, Fritz IB. Extracellular matrix promotes rat Sertoli cell histotypic expression in vitro. Biology of Reproduction. 1984;30:213-29.

Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. Journal of Cell Science. 2004;117:2435-47.

Van Vuren JHJ, Soley JT. Some ultrastructural observations of Leydig and Sertoli cells in the testis of *Tilapia rendalli* following testicular recrudescence. Journal of Morphology. 1990;260:57-63.

Vine E, Shears J, van Aerle R, Tyler CR. Sumpter JP. Endocrine (sexual) disruption is not a prominent feature in the pike (*Esox lucius*), a top predator, living in English waters. Environmental and Toxicological Chemestry. 2005;24:1436-43.

Waal PP, Wang DS, Nijenhuis WA, Schulz RW, Bogerd J. Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (*Danio rerio*) testis. Reproduction. 2008;136:225-34.

Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. The radiation-induction block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. Journal Cell Physiology. 2007;211(1):149-58.