

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

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 sul-americanos. 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-histoquímico 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.

1 INTRODUÇÃO

O lambari do rabo amarelo ou tambiuí (*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 espermatozoides.

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.

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) (Osteichthyes - 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 *Gambusia 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. fasciatus* (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 fasciatus* (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 Scoff - 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 remodeling 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 *Padagogobius 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 Society of Nephrology. 1999;10:1337-45.
- Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsuchida 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 20β -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 53rd 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, Tetragnopterae). *Arch Inst Biol* 1936; 7:75-106.
- Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y. Two subtypes of androgen and progesterone 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 follicle-stimulating 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 curimatá *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 vinclozolin 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 environment impacting fish populations?. *Science of the Total Environment.* 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 dihydrocytochalasin 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-do-rabo-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 Iguazu 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 semicyclic 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) (Actinopterygii, 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 (Osteichthyes, 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 Endocrinology*. 2010; 165:390-411.
- Silva JV, Andrade DV, Okano WY. Desenvolvimento sexual e crescimento de lambaris – tambuí, *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 β ,21-trihydroxy-4- pregnen-3-one (20 β -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 groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons teleostens cyprinides. Analyses biochimique des constitutants 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 Chemistry*. 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.