

BARREIRAS DE PERMEABILIDADE NO TESTÍCULO E VIA SEMINAL
DO PEIXE TELEÓSTEO *GYMNOTUS* AFF. *CARAPO*
LINNAEUS, 1758 (TELEOSTEI: GYMNOTIDAE)

LARA CARVALHO MENEGUELLI DE SOUZA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL DE 2013**

BARREIRAS DE PERMEABILIDADE NO TESTÍCULO E VIA SEMINAL
DO PEIXE TELEÓSTEO *GYMNOTUS* AFF. *CARAPO*
LINNAEUS, 1758 (TELEOSTEI: GYMNOTIDAE)

LARA CARVALHO MENEGUELLI DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL DE 2013

BARREIRAS DE PERMEABILIDADE NO TESTÍCULO E VIA SEMINAL
DO PEIXE TELEÓSTEO *GYMNOTUS* AFF. *CARAPO*
LINNAEUS, 1758 (TELEOSTEI: GYMNOTIDAE)

LARA CARVALHO MENEGUELLI DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 04 de abril de 2013

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Gomes da Silva – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Nadir Francisca Sant'anna – UENF

Prof. Dr. Dácio Ricardo de Andrade – UENF

Prof^a Dr^a. Maria Luisa López Alvarez - Co-orientadora

Prof^a. Associada - LBCT/CBB/UENF

Prof. Dr. Claudio Retamal Martinez - Orientador

Prof. Associado - LBCT/CBB/UENF

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – Setor de Biologia da Reprodução – do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob orientação do professor Claudio A. Retamal Martinez e da professora Maria Luisa López Alvarez.

Apoio Financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.

Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, FAPERJ.

Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que está sempre ao meu lado me apoiando e dando forças para seguir meus sonhos; e a família maravilhosa que Ele me deu! João Batista, Maria Aparecida e Annaliza! Amo vocês! Agradeço também a todos que me ajudaram a vencer mais este obstáculo! Obrigada!!!

***“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”
(Mahatma Gandhi).***

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, quero agradecer a Deus por estar finalizando mais uma etapa. Tenho certeza que Ele está sempre ao meu lado, me ajudando e guiando em cada momento de minha vida.

Aos meus queridos orientadores, Maria Luisa López e Claudio Retamal. Obrigada, não só pelos ensinamentos passados, mas também pela amizade de todos esses anos. Aprendi muito com vocês!

Aos meus pais, pelo amor incondicional, e por todo o apoio que eles sempre me deram, desde a graduação até agora. Muito obrigada por tudo! Vocês são os melhores! Amo muito!!!

À minha irmã tão querida e amada, por dividir comigo os bons e também maus momentos. Sempre pronta a me ouvir e a dar conselhos. Minha eterna companheira de república! Te amo!

Ao Caio, um grande companheiro. Sempre pronto a me ajudar e a me ouvir. Além de ter participado ativamente dos meus “trabalhos” com os peixes. Obrigada por tudo!

*Ao pescador, seu Cesar, por, sempre que possível, disponibilizar com boa vontade os exemplares de *Gymnotus aff. carapo* utilizados neste trabalho.*

Aos técnicos do LBCT, em especial, Beatriz Ferreira, Arthur Rodrigues e Adriana Alves por toda ajuda, paciência, competência e pelos ensinamentos passados. Sem eles este trabalho não teria se realizado! E aos amigos e companheiros de laboratório que me ajudaram muito nessa jornada, seja nos experimentos, seja apenas me aconselhando: Gustavo, Janaína, Scooby, Fernanda, Letícia, Lara, João, Cris, Germana, Humberto, Gabriel, Layz, Thais, Viviane, Gil, Brunna, Marianne, Graciele, Dani, Lalita, Ju,...

Aos amigos de graduação, dos quais nunca me esquecerei: Paty, Lailinha, Iara, Keitty Maria, Andressa, Aryane, Lucas, Lupis,...

As amigas de sempre, e a nova: Bia, Nathália e Larissa.

*Ao Prof. Ângelo José Burla Dias, que aceitou ser meu revisor e fez ótimas observações!
Muito obrigada!*

Aos que aqui não citei, mas que me ajudaram de alguma forma! Muito obrigada a todos!!

SUMÁRIO

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O processo espermatogênico	3
2.2 A célula de sertoli e a barreira hematotesticular	12
2.3 O modelo experimental <i>Gymnotus aff. carapo</i>	15
2.3.1 <i>Classificação taxonômica</i>	15
2.3.2 <i>Generalidades da espécie Gymnotus aff. carapo</i>	16
2.3.3 <i>Aspectos reprodutivos de Gymnotus aff. carapo</i>	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 O Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Coleta das amostras	20
4.2 Análise morfológica dos testículos e vias seminais de <i>Gymnotus aff. carapo</i> ..	21
4.3 Investigação de uma barreira de permeabilidade nos testículos e vias seminais de <i>Gymnotus aff. carapo</i>	22
4.4 Verificação da presença de junções oclusivas - criofratura.....	22
4.5 Análise eletroforética do conteúdo luminal dos testículos e vias seminais de <i>Gymnotus aff. carapo</i>	23
4.6 Imunomarcção de ocludina e claudina. Detecção por <i>western blotting</i>	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Análise morfológica dos testículos e vias seminais de <i>Gymnotus aff. carapo</i> ..	26
5.2 Investigação de barreiras de permeabilidade nos testículos e vias seminais de <i>Gymnotus aff. carapo</i>	31
5.3 Avaliação eletroforética do conteúdo luminal dos testículos e via seminais de <i>Gymnotus aff. carapo</i>	32
5.4 Imunomarcção das proteínas ocludina e claudina presentes nas junções oclusivas	35
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	45
8. BIBLIOGRAFIA	47

RESUMO

Interações célula-célula desempenham um papel crucial na regulação e manutenção do processo espermatogênico em mamíferos. Nas gônadas dos machos, a presença de junções oclusivas forma a chamada barreira hematotesticular, que é essencial por fornecer suporte estrutural e fisiológico para o desenvolvimento das células germinativas. Contudo, em peixes, relatos sobre esta estrutura são relativamente escassos. O objetivo do presente trabalho é contribuir com o estudo morfofisiológico do aparelho reprodutor de machos de *Gymnotus aff. carapo*, focando na detecção de uma barreira de permeabilidade similar à descrita em mamíferos. Espécimes adultos foram anestesiados e seccionados ventralmente para a retirada dos testículos e vias seminais. As amostras foram processadas para o estudo a nível óptico e ultraestrutural. Nossos resultados mostraram que a espermatogênese ocorre, sincronicamente, no interior dos espermatocistos. Estas estruturas correspondem a um grupo dinâmico de células de Sertoli envolvendo clones de células germinativas em desenvolvimento. Para verificar a presença de uma barreira de permeabilidade nos testículos e vias seminais foi usada a técnica de exclusão do lantânio (traçador elétron-denso de permeabilidade). Observamos que o lantânio penetrou nos túbulos espermatogênicos e apareceu no interior de cistos de espermatogônias e espermatócitos iniciais, mas foi excluído de cistos de espermatídes e do lúmen dos túbulos espermatogênicos. Nas vias seminais, o lantânio não alcançou o lúmen do ducto, sendo impedido, possivelmente, por junções oclusivas. Outra evidência da presença da barreira de permeabilidade no aparelho reprodutor de *Gymnotus aff. carapo* é a diferença existente no perfil protéico do fluido seminal comparado com aquele do plasma sanguíneo. Através de réplicas de criofratura, visualizamos as junções oclusivas, que aparecem como fileiras paralelas de partículas individuais ou como uma banda formada por fitas selantes anastomosadas; e pela técnica de *Western Blotting* detectamos a presença das proteínas ocludina e claudina presentes nas junções oclusivas. Esses resultados demonstram a existência de uma barreira de permeabilidade formada por junções oclusivas nos testículos, que é estabilizada nas etapas finais da meiose, e que esta barreira tem continuidade nas vias seminais.

Palavras - chaves: *Gymnotus aff. carapo*, espermatogênese, célula de Sertoli, barreira hematotesticular.

ABSTRACT

Cell-cell interactions play essential roles in the regulation and maintenance of mammalian spermatogenesis. In the male gonad, the presence of tight junction form so called blood-testis barrier that is crucial to provide a structural and physiological support for germ cell development. However, in fish, reports about this structure are relatively scarce. The aim of the present work is to contribute the morphophysiological studies of the *Gymnotus carapo*'s reproductive system, focusing primarily on the detection of a permeability barrier similar to the barrier described in mammals. Adult specimens were anesthetized and ventrally sectioned to the removal of the testes and seminal pathways. The samples were processed for the study at optical and electron microscopy. Our results showed spermatogenesis occurs, synchronously, within the spermatocysts. These structures consist of a dynamic group of Sertoli cells surrounding germ cell clones developing. In order to verify the presence of permeability barrier was used the technique of excluding lanthanum (electron-dense marker of permeability). We observed that lanthanum penetrated spermatogenic tubules and appeared within cysts of spermatogonia and spermatocytes in early stages of meiotic prophase, however, it was excluded from cysts of spermatids and the lumen of the spermatogenic tubules. In the seminal pathway, lanthanum has not reached the lumen of the duct, being prevented possibly by the tight junctions. Another evidence of the presence of a permeability barrier on the reproductive system of *Gymnotus aff. carapo* is the difference in the electrophoretic protein profile of seminal fluid compared with the blood plasma. Furthermore, by cryofracture, we visualized tight junctions, that appear as parallel rows of individual particles or as a band formed by ribbons anastomotic sealants; and by Western Blotting technique, we detected the presence of occludin and claudin proteins that are present in tight junctions. These results demonstrate that there is a permeability barrier formed by tight junctions in the testes, which is stabilized in the final stages of meiosis, and this barrier has continuity in the seminal pathways.

Keywords: *Gymnotus aff. carapo*, spermatogenesis, Sertoli cell, blood-testis barrier.

1. INTRODUÇÃO

A gênese e diferenciação do espermatozóide envolvem uma cascata de processos complexos e interdependentes que progridem de forma sequencial e regulada, finalizando na produção de uma célula haplóide potencialmente fértil. Apesar dos importantes avanços da pesquisa nesta área, ainda existem questões que necessitam serem elucidadas, aprofundadas ou validadas nas diferentes espécies (EDDY E O'BRIAN, 1994; HERMO et al., 2010). Em termos gerais, a espermatogênese é um processo bem conservado. Entretanto, há variações entre espécies no que diz respeito à organização testicular, aos padrões espermatogênicos e às características morfológicas do gameta maduro, as quais estão relacionadas aos aspectos filogenéticos, estratégias reprodutivas e/ou comportamentais das diferentes espécies. Em anamniotes (peixes e anfíbios) o processo espermatogênico ocorre em espermatocistos, os quais se desenvolvem no interior de lóbulos ou túbulos seminíferos (espermatogênese cística). Enquanto a espermatogênese progride, formam-se clones de espermatozóides isogênicos que são liberados no lúmen do túbulo, pela ruptura do cisto. Nestas espécies, não existe um epitélio germinal permanente e novos cistos são formados durante as sucessivas estações reprodutivas. Em amniotes (répteis, aves e mamíferos), a espermatogênese não ocorre em cistos, mas em túbulos seminíferos que apresentam uma população permanente tanto de espermatogônias (células germinais de reserva para os sucessivos ciclos da atividade espermatogênica) quanto de células de Sertoli (células somáticas que participam da manutenção da estrutura testicular e da regulação do processo espermatogênico). Os principais promotores deste processo são os hormônios do eixo hipotálamo - hipófise - gônada, existindo também fatores autócrinos e parácrinos que participam da sua regulação (LOIR et al., 1995; PUDNEY, 1995; SCHULZ et al., 2010).

As células germinais maturam em íntima associação com as células de Sertoli. Estas células têm um papel chave no processo espermatogênico, pois, além de nutrir e proteger as células germinativas, formam parte de uma barreira de permeabilidade que permite a manutenção de um microambiente altamente especializado que separa as células germinativas jovens (diplóides) das maduras (haplóides). A barreira hematotesticular é uma estrutura de grande importância fisiológica, já que, além de

restringir a passagem de água, íons, aminoácidos, hormônios e outras moléculas, do compartimento basal ao compartimento adluminal do túbulo seminífero, sequestra antígenos que possam ser expressos em etapas pós-meióticas, impedindo a produção de auto-anticorpos que afetem a integridade dos gametas. A existência anatômica e funcional da barreira hematotesticular tem sido estabelecida nas gônadas de numerosas espécies, principalmente mamíferos (BYERS et al., 1993; LÓPEZ, 1996; HERMO et al., 2010). Ainda sendo razoável assumir a continuação de uma barreira funcional nas vias seminais, esta tem sido menos estudada (HOFFER E HINTON, 1984; LÓPEZ et al., 1997).

As bases estruturais destas barreiras de permeabilidade são complexos protéicos multiméricos presentes nas junções oclusivas, que se estabelecem entre células de Sertoli adjacentes (no testículo) e entre as células epiteliais (nas vias seminais). Embora as funções atribuídas a estas junções permaneçam vigentes, dados mais recentes indicam que elas apresentariam um dinamismo maior que aquele anteriormente previsto. Um modelo de junção oclusiva baseado em uma rede flexível de estruturas protéicas explicaria melhor seu papel na regulação da permeabilidade paracelular ou nos mecanismos de sinalização associados aos complexos juncionais (CHENG et al., 2010; STEED et al., 2010).

Apesar de existirem aproximadamente trinta mil espécies de peixes com características morfofuncionais e estratégias reprodutivas diferentes, nossos conhecimentos sobre os aspectos estruturais e moleculares do sistema reprodutor dos machos e, especificamente, sobre barreiras de permeabilidade nas gônadas e vias seminais neste grupo de vertebrados são ainda incipientes. No presente trabalho foi proposto analisar a organização estrutural dos testículos e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo*, um membro da família Gymnotidae amplamente distribuído na América Central e do Sul, visando verificar a presença de barreiras de permeabilidade que contribuam com a criação de um microambiente favorável ao desenvolvimento do processo espermatogênico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O processo espermatogênico

A espermatogênese é um processo longo, cíclico e contínuo, que se inicia na puberdade e se estende por grande parte da vida do indivíduo. Muitos capítulos, revisões, livros, artigos têm sido escritos e continuam publicando-se sobre a gênese e diferenciação dos espermatozóides das diferentes espécies de vertebrados. Uma das últimas e mais completas revisões sobre o processo espermatogênico em mamíferos é a publicação de HERMO et al. (2010).

Em mamíferos, a organização testicular é do tipo tubular. Como se observa na figura 1A, os túbulos seminíferos formam alças que se estendem da periferia até a região da rede testicular (*rete testis*). No testículo, visualizam-se dois compartimentos principais, o tubular e o intertubular ou intersticial (figura 1B). Neste último observam-se, entre outros elementos do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, linfáticos e células de Leydig (fonte de diversos esteróides que participam da regulação da função testicular). O compartimento tubular é formado pelo epitélio seminífero, que está delimitado pela lâmina basal e por uma ou mais camadas de células mióides, as quais proporcionam força motriz para o movimento de fluidos e espermatozóides durante a espermição. No epitélio seminífero observam-se dois tipos de células morfofuncionalmente diferentes: as células somáticas ou de Sertoli e as células que constituem a linhagem germinativa, ambas sob influência das gonadotrofinas hipofisárias. Entretanto, interações locais entre células de Sertoli e células germinativas, células de Sertoli e células peritubulares e entre células de Sertoli e células de Leydig, incluindo as vias de sinalização dependentes, contribuem de forma significativa para a coordenação das funções dos diferentes compartimentos testiculares, regulando assim a sequência de eventos que constituem o ciclo espermatogênico (SHARPE, 1986; RUSSELL et al., 1990; HERMO et al., 2010; MRUK E CHENG, 2010).

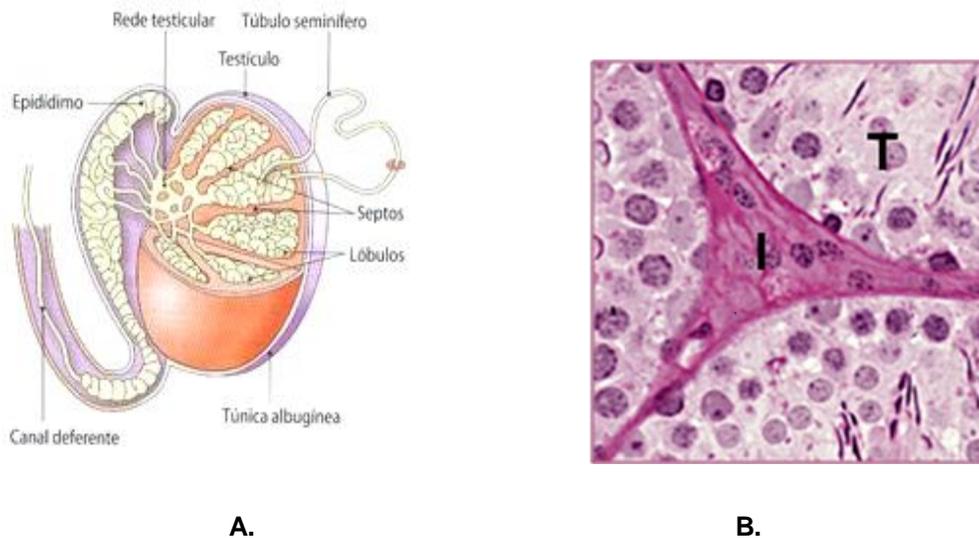


Figura 1. A. Diagrama de um corte sagital de testículo e vias seminais de mamíferos. **B.** Compartimentos tubular (T) e intersticial (I) do testículo. (Fonte: <http://bio12-ciencia.blogspot.com.br>).

A espermatogênese inicia-se com a proliferação ou amplificação das células da linhagem germinativa. As espermatogônias do tipo A darão origem, por sucessivas divisões mitóticas, a espermatogônias tipo A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , espermatogônia intermediária (In) e espermatogônia tipo B (em roedores) ou a espermatogônias pálidas e escuras (no homem). As espermatogônias indiferenciadas (“stem cells”) podem se auto-renovar, gerar um grande número de células germinais diferenciadas ou morrer via apoptose. O desenvolvimento espermatogênico sincronizado é facilitado pela manutenção de pontes citoplasmáticas entre as células germinativas, resultado da citocinese incompleta durante as divisões celulares. As espermatogônias B se dividem para formar os espermatócitos primários, os quais crescem, duplicam seu DNA e logo entram na fase meiótica. Da primeira divisão meiótica resultam os espermatócitos de segunda ordem ou tipo II, que possuem a metade do número de cromossomos da espécie, mas com duas cromátides cada um. Os espermatócitos II logo entram na segunda divisão meiótica, da qual resultam células haplóides, cujos cromossomos apresentam uma cromátide cada um, as espermátides. Na fase espermiogênica, as espermátides se diferenciam em espermatozóides, experimentando drásticas modificações estruturais que incluem modificação da forma do núcleo e condensação da cromatina, desenvolvimento do capuz acrossomal, remodelamento da membrana plasmática,

formação do aparelho flagelar, entre outras, que lhes permitem se transformar em vetores flagelados e móveis do genoma (RUSSELL et al., 1990; HERMO et al., 2010; PHILLIPS et al., 2010).

Como mencionado anteriormente, a espermatogênese apresenta muitas similaridades entre os vertebrados; entretanto o número de gerações de espermatogônias, o processo de diferenciação das espermátides, a morfologia espermática, o número de estágios ou associações celulares e a duração desse processo apresentam variações entre as espécies, fornecendo assim parâmetros para análise filogenética (RUSSELL et al., 1990; PHILLIPS et al., 2010; SCHULZ et al., 2010).

Em peixes, a organização testicular difere não somente da observada em mamíferos, mas também entre as espécies pertencentes a este grupo de vertebrados. De acordo com GRIER (1993), em peixes teleósteos inferiores (osteichthyes basais) o testículo é do tipo tubular anastomosado - o compartimento germinativo é formado por alças e túbulos ramificados que se interconectam da periferia até o ducto testicular principal; em peixes mais desenvolvidos (Neoteleostei) o testículo é do tipo lobular e o epitélio germinativo apresenta-se em formato digitiforme (com fundo cego) na periferia ventro-lateral do testículo (figura 2).

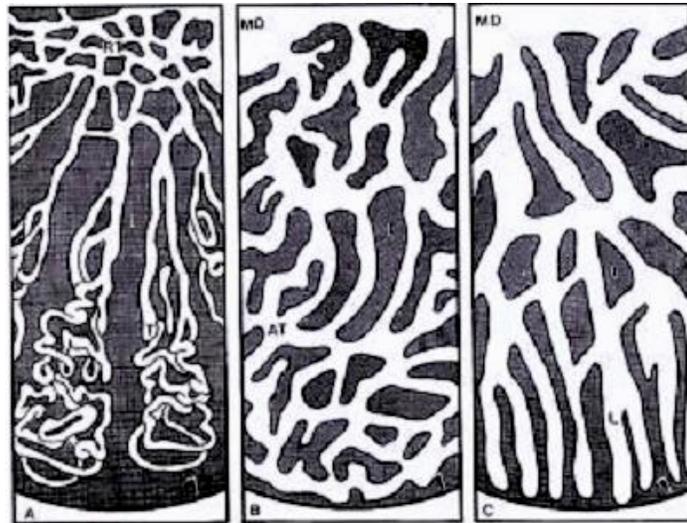


Figura 2. Organização do compartimento germinativo. **A:** Tipo Tubular (T). Os túbulos seminíferos formam alças que se estendem da periferia até a rede testicular (RT), encontrado nos mamíferos. **B:** Tipo Tubular Anastomosado (AT) O compartimento germinativo é formado por túbulos interconectados, desde a periferia até o ducto testicular principal (MD), encontrado em teleósteos basais. **C:** Tipo Lobular (L) encontrado em neoteleósteos. O compartimento germinativo termina em formato digitiforme e pode sofrer ramificações (anastomoses) apenas na região próxima ao ducto testicular principal (MD). Interstício (I). (Fonte: GRIER, 1993).

Geralmente, a espermatogênese em peixes é um processo mais curto do que em mamíferos. Postula-se que, nesse grupo de vertebrados, a linhagem espermatogênica se iniciaria a partir da associação de uma espermatogônia primária com uma célula de Sertoli, dando início a formação do cisto espermatogênico (figura 3A) (PUDNEY, 1993; LOIR et al., 1995; SCHULZ et al., 2010). Para esses autores, a unidade morfofuncional da espermatogênese em peixes é o cisto, que corresponde a uma célula germinal ou a clones de células germinais isogênicas envolvidas por uma ou várias células de Sertoli, as quais formam a parede do cisto e acompanham as células germinais através dos diferentes estágios da espermatogênese (figura 3B). Em um dado cisto, todas as células germinativas estão no mesmo estágio de desenvolvimento.

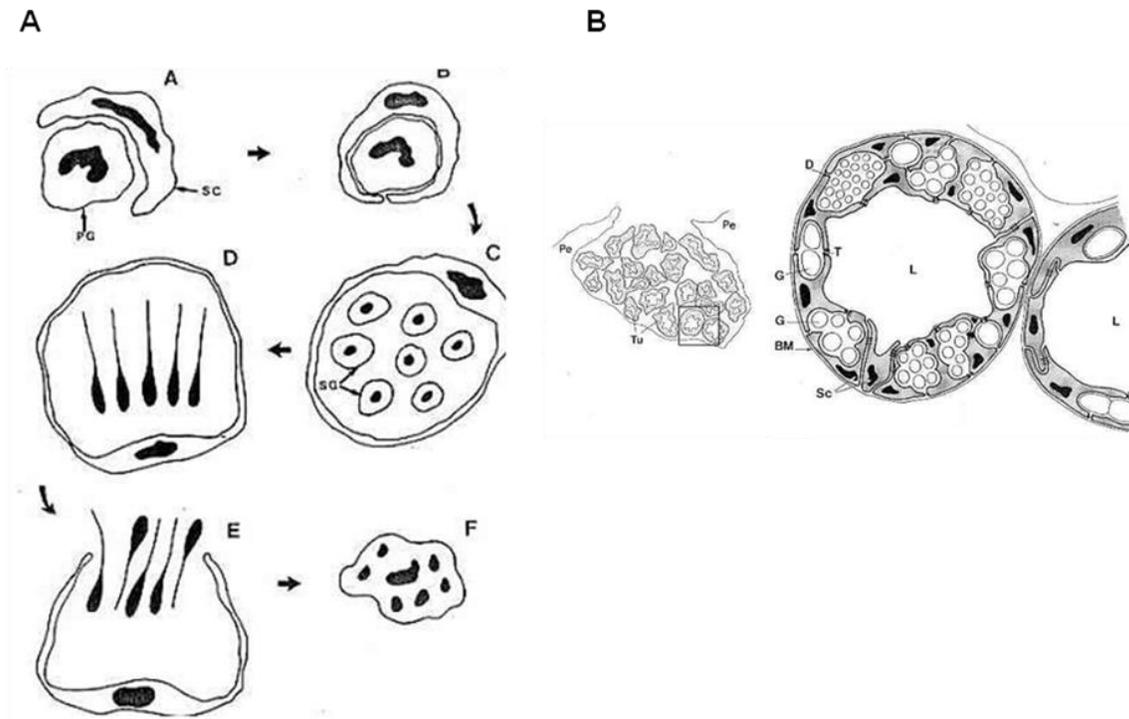


Figura 3. Diagramas de espermatocistos em peixes. A: Formação de um cisto, que se inicia com a associação de uma célula de Sertoli com uma espermatogônia primária. A célula de Sertoli envolve completamente esta célula, formando um cisto. A espermatogônia primária inicia o processo espermatogênico, até originar os espermatozoides, que são liberados para o lúmen tubular pela ruptura do cisto. Ainda não está claro se ocorre degeneração da célula de Sertoli após o rompimento do cisto. Espermatogônia Primária (PG), Espermatogônia Secundária (SG), Célula de Sertoli (SC) (Fonte: PUDNEY, 1993). B: Detalhes de um túbulo espermatogênico em peixes. Peritônio (Pe), túbulo espermatogênico (Tu), lúmen (L), membrana basal (BM), célula de Sertoli (Sc), espermatogônia (G), junção oclusiva (T) e desmossomo (D) (Fonte: PARMENTIER et al., 1985).

Uma nomenclatura similar à utilizada em vertebrados superiores tem sido utilizada para denominar as gerações de células germinativas em peixes (SCHULZ et al., 2010). Estes autores descrevem espermatogônias tipo A indiferenciadas e diferenciadas, sendo que estas últimas apresentam um potencial reduzido de auto-renovação. As espermatogônias tipo A diferenciadas darão origem a espermatogônias do tipo B (que são divididas em espermatogônias tipo B iniciais e espermatogônias tipo B tardias), sendo que o número de gerações deste tipo celular varia entre espécies e é geneticamente determinado. Como em mamíferos, pontes citoplasmáticas interconectam as células germinativas no interior dos cistos. As espermatogônias B tardias darão origem aos espermátocitos, que logo entram na fase meiótica, na qual o material genético é duplicado, recombinado e segregado. Por último, ocorre a fase

espermiogênica, na qual a espermatíde se diferencia em espermatozóide (BILLARD et al., 1982; PUDNEY, 1995).

Em mamíferos, durante a espermiogênese, são formadas junções específicas (especializações ectoplasmáticas - ES) entre as espermatídes maduras e os recessos apicais das células de Sertoli, as quais são desintegradas durante a espermição. Tem sido observado que simultaneamente a este processo de liberação do espermatozóide no lúmen do túbulo seminífero, a barreira hematotesticular (BHT), localizada perto da base do epitélio, sofre extensivas reestruturações que permitem a passagem de espermatócitos pré-leptotênicos ao compartimento adluminal, onde ocorre a fase meiótica e diferenciação das células germinais. Os mecanismos que subjazem a ambos os processos não estão totalmente esclarecidos. Estudos recentes têm demonstrado que fragmentos de laminina são gerados do complexo protéico laminina/integrina presente nas junções ectoplasmáticas, mediante a ação de metaloproteases (MMP-2), durante a espermição. Estes peptídeos poderiam atuar como fatores autócrinos locais na desestabilização da BHT. Esses peptídeos também parecem exercer algum efeito nos hemidesmosomos, os quais poderiam potencializar a estruturação da barreira. Assim, um novo mecanismo de regulação via junções ectoplasmáticas - BHT está sendo sugerido nesses dois eventos cruciais do processo espermatogênico (figura 4) (CHENG E MRUK, 2009; KOPERA et al., 2010).

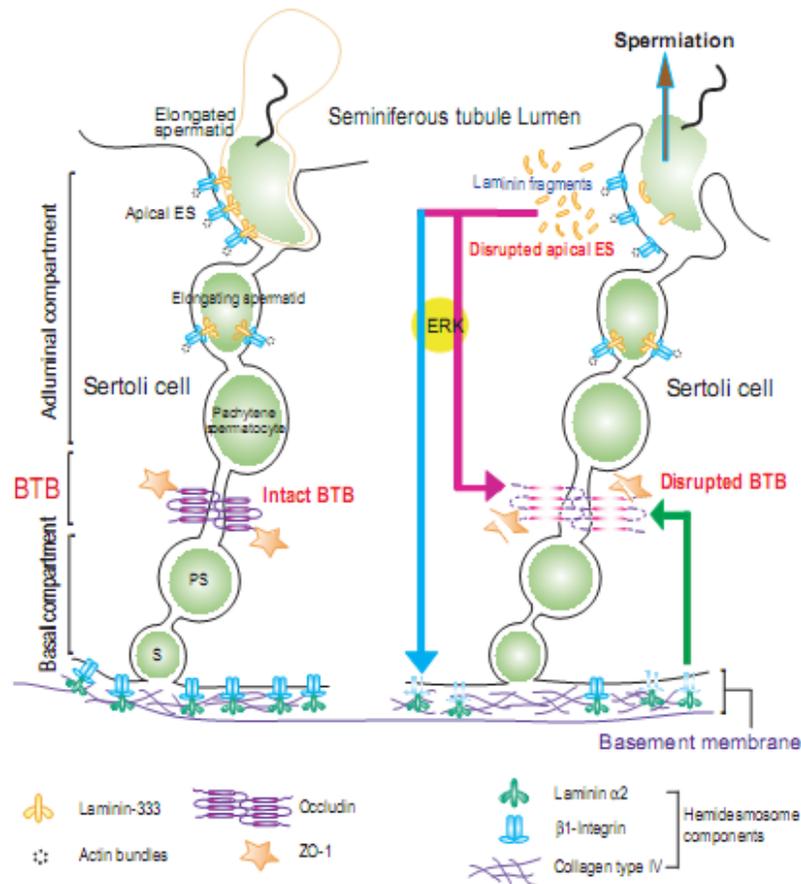


Figura 4. Desenho esquemático ilustrando um tipo de regulação autócrina proposto no testículo de rato. Durante a espermição, fragmentos de laminina liberados do complexo laminina/integrina na ES apical reduziriam o nível de ocludina na BHT (seta rosa). Estes fragmentos também podem reduzir o nível de integrina nos hemidesmosomos (seta azul), desestabilizando a BHT via um mecanismo de *feedback* (seta verde). Coletivamente, estes efeitos combinados facilitam o trânsito de espermatócitos pré-leptotênicos através BHT. Este mecanismo de regulação autócrina coordenaria, assim, a espermição e a reestruturação da BHT que ocorre nas extremidades opostas do epitélio de células de Sertoli. (Fonte: YAN et al., 2008).

Em peixes, tanto o número de células germinativas quanto o número de células de Sertoli aumentam durante o processo espermatogênico. O grande aumento no volume do cisto ocorre durante o período de rápida expansão mitótica das espermatogônias, o que pode explicar a razão pela qual a proliferação de células de Sertoli encontra-se principalmente associada a cistos espermatogoniais. Tem sido sugerido que estas células são formadas por mitose apenas no tempo exato e no número exigido. Esse fato pode indicar, em parte, que a espermatogênese cística é mais eficiente do que a espermatogênese não cística em mamíferos, como indicado por parâmetros tais como a baixa porcentagem de células germinativas apoptóticas (30% no peixe; aproximadamente 60-80% em ratos ou camundongos), resultando,

consequentemente, em um maior rendimento espermatogênico. Além disso, em peixes, as células de Sertoli associam-se a um clone de células germinativas por vez, concentrando os fatores de crescimento específicos necessários para cada fase de desenvolvimento; ao contrário das células de Sertoli de mamíferos que estão em contato com diferentes clones de células germinativas ao mesmo tempo (SCHULZ et al., 2010).

Em peixes teleósteos, no final da espermiogênese, quando as pontes intercelulares são rompidas e os espermatozóides individualizados, os complexos juncionais existentes entre as células de Sertoli que formam o cisto sofrem uma remodelação dinâmica que culmina na abertura do cisto e, consequentemente, na liberação de espermatozóides para o lúmen tubular. Ainda não estão descritos os mecanismos que subjazem a este processo (SCHULZ et al., 2010). Assim, descrevem-se dois tipos de espermatogênese, baseados na fase de desenvolvimento em que as células germinativas se encontram no momento do rompimento da parede do cisto e são eliminadas para a luz do túbulo: a) espermatogênese tipo cística, na qual a espermatogênese é completada dentro dos cistos (ex. *Gambusia affinis holbrooki*); b) espermatogênese semi-cística, na qual a liberação de células germinativas ocorre no estágio de espermatíde (ou espermatócito secundário) e a espermiogênese (e meiose) é (são) finalizada (s) no lúmen tubular. Este tipo é encontrado em diferentes grupos taxonômicos, como Opheliidae, Scorpaenidae, Bleniidae, Corydoradinae e Soleidae (MATTEI et al., 1993; SCHULZ et al., 2010).

As interações célula-célula, incluindo as vias de sinalização dependentes, são essenciais na regulação da espermatogênese e na manutenção do fenótipo macho (MRUK E CHENG, 2004; 2010). Estas interações, das quais participam elementos estruturais e proteínas específicas, estão relacionadas com a adesão celular, com a difusão paracelular, com o estabelecimento da polaridade celular, com a formação da barreira hematotesticular, entre outras funções. Enquanto muitos estudos têm focado nas interações topográficas e funcionais entre os diversos tipos celulares presentes nos testículos de mamíferos (DYM E FAWCETT, 1971; GRISWOLD, 1998; SIU E CHENG, 2004; HERMO et al., 2010; POINTIS et al., 2010), poucos trabalhos têm sido publicados focalizando nas interações entre células germinais e células de Sertoli ou entre células

de Sertoli em peixes. Neste grupo de vertebrados, assim como em mamíferos, interações célula-célula têm sido observadas na interface Sertoli - Sertoli, Sertoli - célula germinal ou entre células germinais, e provavelmente estejam envolvidas na transmissão de sinais que regulam a renovação e proliferação espermatogonial, a fase meiótica, a fase espermiogênica, a apoptose das células germinais, entre outros eventos (HERMO et al., 2010; POINTIS et al., 2010).

Várias formas de junções celulares têm sido observadas em peixes teleósteos (BATLOUNI et al., 2009). Dados morfológicos descritos por estes autores indicam que a união entre célula de Sertoli - célula germinal e entre células germinais mantém a estrutura tridimensional dos cistos e a organização das células germinais durante a espermatogênese. O cisto germinativo é uma estrutura organizada e resistente que permanece estável durante todo o processo espermatogênico, dada à participação de elementos do citoesqueleto, os quais provavelmente formam uma rede interconectada entre as células que compõem o cisto (BATLOUNI et al., 2005). PFEIFFER E VOGL (2002) assinalam que duas junções celulares adesivas diferentes, uma associada aos filamentos de actina e a outra aos filamentos intermediários, similares a zônula adherens ou puncta adherens, encontradas em outros epitélios, ocorrem entre células de Sertoli de peixes Agnathas. Junções adesivas também são encontradas entre células de Sertoli e células germinais e entre células germinais e células germinais, e estas junções têm sido denominadas junções “tipo desmossomos”. Conexinas e nexos também têm sido observados em células testiculares de peixes e poderiam estar envolvidas no desenvolvimento sincrônico das células germinais (LOIR et al., 1995; BATLOUNI et al., 2005). Entretanto, as junções aderentes ectoplasmáticas parecem estar presentes somente em alguns peixes cartilagosos e poderiam fazer parte do mecanismo geral pelo qual se determina a orientação das espermátides. Segundo VOGL et al. (2000), esse tipo de junção estaria restrito a mamíferos, especificamente a mamíferos placentários. Contudo, pouco é conhecido sobre a composição de junções aderentes associadas à actina entre células de Sertoli em peixes teleósteos (PFEIFFER E VOGL, 1994; VOGL et al., 2000; PFEIFFER E VOGL, 2002). Junções do tipo oclusivas ou seladoras já foram descritas em algumas espécies de peixes teleósteos e tem sido sugerido que poderiam formar parte de uma barreira de permeabilidade (ABRAHAM et al., 1980; BERGMANN et al., 1984; LOU E TAKAHASHI, 1989). Nestes

diferentes tipos de interações participariam proteínas específicas relacionadas com a adesão celular (caderinas, cateninas, nectinas, integrinas) e com as junções oclusivas (occludinas, claudinas). Ainda não estando bem investigadas, as interações celulares no epitélio germinativo de peixes seriam também cruciais no desenvolvimento das células germinativas, e alterações na sua estrutura poderiam afetar a fertilidade deste grupo de vertebrados.

Ao contrário de mamíferos, em que a estrutura testicular é relativamente estável, os testículos de peixes, especialmente os de reprodutores sazonais, sofrem drásticas mudanças morfofuncionais durante o ciclo reprodutivo. Apesar das variações espécie-específica, em geral, a estrutura do epitélio seminífero de peixes teleósteos muda de uma monocamada de células de Sertoli que contém algumas espermatogônias (estação não reprodutiva) para um arranjo espermatogênico ativo composto de células germinativas em desenvolvimento que preenchem o lúmen tubular (estação reprodutiva). Estas mudanças estruturais demonstraram ter efeito direto nos tipos e distribuição das junções celulares no epitélio seminífero (BATLOUNI et al., 2009).

2.2 A célula de Sertoli e a barreira hematotesticular

Os primeiros estudos sobre células de Sertoli foram feitos por Enrico Sertoli em 1865, em imagens microscópicas de testículos humanos impregnados com cloreto de mercúrio. Ele as descreveu como células colunares com processos ramificados onde as células germinativas estão localizadas e as denominaram “*cellule ramificate*”. Em 1899, Peter descreveu a presença de células “nurse” (Sertoli) em peixes teleósteos e sugeriu uma função trófica para elas, sendo o primeiro relato de células de Sertoli em anamniotes (PUDNEY, 1993).

As células de Sertoli são as primeiras células somáticas a se diferenciarem nos testículos de vertebrados, e desempenham um papel importante na regulação da espermatogênese, além de direcionar a diferenciação, o desenvolvimento e o funcionamento dos testículos (figura 5).

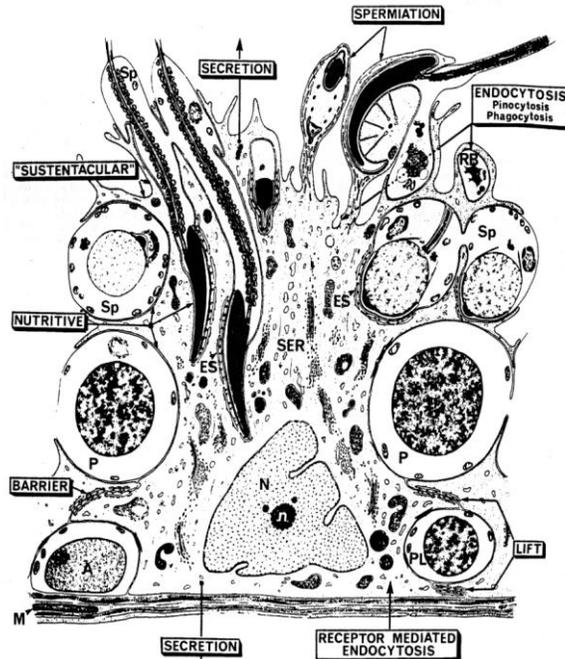


Figura 5. Diagrama da célula de Sertoli no epitélio seminífero de roedores. (Fonte: CLERMONT, 1993).

In vivo, as células germinativas somente podem sobreviver em contato com as células de Sertoli, de modo que o número destas células determina a capacidade espermatogênica do testículo em vertebrados (GRISWOLD, 1998; JOHNSON et al., 2008; SCHULZ et al., 2010). Em peixes, funções similares às descritas em mamíferos têm sido atribuídas às células de Sertoli, entre elas dar suporte ao desenvolvimento e diferenciação das células germinais durante o processo espermatogênico; nutrição; síntese de esteróides e de diversas proteínas (proteína ABP que se liga a andrógenos, inibina, transferrina e ceruloplasmina); fagocitose de corpos residuais e de células germinativas e formação de parte da barreira hematotesticular. Além destas funções, em peixes, as células de Sertoli também participam da formação dos espermatocistos, de ductos eferentes, do espermatóforo e do espermatózeugmata, sendo os três últimos em peixes de fecundação interna (NICHOLLS E GRAHAM, 1972; ABRAHAM et al., 1980; GRIER et al., 1981; PUDNEY, 1993; SCHULZ et al., 2010).

Em vertebrados amniotes (répteis, aves e mamíferos) a célula de Sertoli localiza-se junto à lâmina basal dos túbulos seminíferos e seu citoplasma envolve as células germinativas, estendendo-se até o lúmen tubular. Essas células proliferam até a puberdade, quando somente espermatogônias e poucos espermatócitos estão

presentes no epitélio germinal. Os testículos de mamíferos adultos contêm um número fixo de células de Sertoli que suportam sucessivas ondas espermatogênicas. Durante estas ondas, uma única célula de Sertoli está em contato com células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimentos. Já em vertebrados anamniotes (peixes e anfíbios), as extensões citoplasmáticas destas células envolvem completamente um clone de células germinativas. Durante a etapa de involução testicular essas células podem ser perdidas, devendo ser formadas novamente durante a próxima estação reprodutiva, quando a proliferação espermatogonial for retomada (SCHULZ et al., 2010). Em mamíferos, as junções oclusivas entre células de Sertoli contíguas são a base estrutural de uma barreira que restringe e/ou regula a passagem de moléculas em direção ao lúmen do túbulo seminífero ou vice-versa. Esta barreira é chamada de barreira hematotesticular e, além de criar um microambiente crítico para o desenvolvimento das células germinais e contribuir na polaridade da célula de Sertoli, divide anatomicamente o epitélio seminífero em dois compartimentos. No compartimento basal do túbulo encontram-se espermatogônias e espermatócitos até o estágio de pré-leptóteno; estas células teriam um acesso relativo a substâncias provenientes da linfa e do sistema vascular. No compartimento adluminal, encontram-se espermatócitos, espermátides e espermatozóides. Um terceiro compartimento, conhecido como compartimento intermediário, se formaria transientemente durante a passagem de células em pré-leptóteno ao compartimento adluminal, e envolve a formação e a quebra sucessiva das junções oclusivas. A presença de um compartimento intermediário permite a integridade da barreira durante o trajeto das células da base ao compartimento adluminal. Essa compartimentalização pode segregar as células germinativas de fatores imunogênicos e, assim, permitir o desenvolvimento e a maturação de espermatozóides, função primordial desta barreira de permeabilidade (FAWCETT et al., 1970; FRANCHI et al., 1982; RUSSELL et al., 1990; BARDIN et al., 1994, BATLOUNI et al., 2009).

Nos últimos anos tem sido descrito (em roedores, primatas e humanos) uma associação funcional entre as junções oclusivas entre células de Sertoli adjacentes com outras junções especializadas, como as especializações ectoplasmáticas, nexos e junções semelhantes à desmosomas, as quais poderiam formar parte desta barreira. Além disso, essas junções estão relacionadas a proteínas citoplasmáticas, como os

filamentos de actina, tornando à barreira hematotesticular uma ultraestrutura única e complexa (CHENG E MRUK, 2010). Mais de 100 proteínas associadas a junções oclusivas têm sido detectadas, entre elas ocludina, claudina, tricelulina, moléculas de adesão juncional (JAM), zônula ocludente-1 (ZO1), etc. Alguns estudos sugerem que a presença e distribuição de determinadas classes de claudinas, por exemplo, poderia estar relacionada com as variações observadas na permeabilidade das junções oclusivas (ANDO-AKATSUKA et al., 1996; TSUKITA et al., 2001).

Estudos sobre a presença de uma barreira funcional nos testículos e vias seminais de teleósteos são mais escassos. Neste grupo, somente espermatídes e espermatozóides estão protegidos pela barreira (ABRAHAM et al., 1980; BERGMANN et al., 1984; SHIBATA E HAMAGUCHI, 1986), ao contrário de aves e mamíferos, onde espermatócitos também se tornam incluídos imediatamente após entrarem na meiose.

2.3. O modelo experimental *Gymnotus aff. carapo*

2.3.1 Classificação taxonômica

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Classe Actinopterygii

Infraclasse Teleostei

Ordem Gymnotiformes

Família Gymnotidae

Gênero *Gymnotus*

Espécie *Gymnotus aff. carapo*



Figura 6. Vista lateral do peixe teleósteo *Gymnotus aff. carapo* (Linnaeus, 1758). (Fonte: arquivo próprio).

2.3.2 Generalidades da espécie *Gymnotus aff. carapo*

A família Gymnotidae é constituída pelos gêneros: *Electrophorus* com uma espécie válida e *Gymnotus* com 34 espécies válidas (LOVEJOY et al., 2010). O gênero *Gymnotus* é um importante componente da fauna neotropical de água doce e apresenta a maior distribuição geográfica entre os Gymnotiformes, tendo o limite de distribuição entre o Rio Salado, nos Pampas da Argentina, e o rio San Nicolas, no México; sendo encontrado também na ilha de Trinidad no Caribe (CRAMPTON E HOPKINS, 2005; DE PAULA COGNATO E BERNHARDT FIALHO, 2006).

Como outros grupos de Gymnotiformes, o gênero *Gymnotus* apresenta um grande número de espécies crípticas (morfologicamente similares), difíceis de serem diferenciadas macroscopicamente. Na literatura, o nome específico *Gymnotus carapo* tem sido utilizado em um sentido amplo e parece se referir a mais de uma espécie (ALBERT et al., 2004). Porém, ALBERT E CRAMPTON (2003) têm descrito "*Gymnotus carapo sensu stricto*" restringindo sua distribuição às bacias da Amazônia e Orinoco, ilha Trinidad e drenagem dos rios Pindaré, Itapicuru e Parnaíba. Tal distribuição exclui a população estudada por BARBIERI E BARBIERI (1981, 1982ab, 1983ab, 1984abc, 1985), VAZZOLER (1996), SILVA et al. (2003) entre outros autores.

Os Gymnotiformes, em geral, possuem um corpo alongado, lateralmente comprimido (anguiliforme), olhos pequenos, mandíbula prognata, ampla fenda bucal, abertura branquial muito estreita, são desprovidos das nadadeiras dorsal, pélvica e caudal; mas possuem uma nadadeira anal muito desenvolvida, a qual se estende por quase toda a face ventral. O ânus está localizado em posição anterior, próximo às nadadeiras peitorais. Deslocam-se na água por movimentos ondulatórios da nadadeira anal (MAGO-LECCIA, 1994; THEODORO, 2003; ROTTA, 2004).

Dentre as características mais marcantes dos Gymnotiformes, destaca-se a capacidade de produzir e detectar campos elétricos de diferentes intensidades, que utilizam para sua orientação (compensando assim sua falta de visão na hora de predar espécies menores) e para facilitar as interações sociais na época de reprodução (WESTBY, 1975; USHIZIMA E BOCK, 2000). Segundo ALBERT E CRAMPTON (2005), essas estruturas teriam um papel central na diversificação evolutiva e especialização ecológica das espécies.

Gymnotus carapo, como outros membros da ordem, possui um sistema alternativo de respiração (respiração aérea facultativa), adaptação comum em peixes que evoluíram em ambientes de baixo teor de oxigênio (CRAMPTON, 1998). Por isso suportam condições bastante precárias, o que lhes dá a fama de serem uma das melhores iscas vivas para pesca esportiva, pois dificilmente morrem durante o transporte.

Estudos biológicos e ecológicos de *Gymnotus carapo* no Pantanal – MG realizados por RESENDE (1999) e RESENDE E PEREIRA (2000) mostraram que estes peixes (conhecidos na nomenclatura popular como tuvira, sarapó, carapó, ituí, morenita) vivem em ambientes lânticos, com plantas aquáticas de raizame denso que retém muita matéria orgânica, onde se abrigam e encontram alimento. Possuem hábito noturno e se alimentam de forma seletiva, ingerindo organismos disponíveis no ambiente, preferencialmente insetos e microcrustáceos encontrados usualmente nas margens dos corpos de água, como canais fluviais, planícies inundadas e pântanos alagados (SILVA E OLIVEIRA, 1997abc; RESENDE, 1999; RESENDE E PEREIRA, 2000).

2.3.3 Aspectos reprodutivos de *Gymnotus aff. carapo*

A reprodução de *Gymnotus carapo* é cíclica, dependente de fatores endógenos (gênicos e hormonais) e abióticos, sazonalmente variáveis, como temperatura, nível da água, concentração de oxigênio dissolvido, precipitação pluviométrica e fotoperíodo. O sucesso reprodutivo é um fator essencial à sobrevivência das espécies, de forma que os períodos de reprodução se ajustam a uma fase do ciclo sazonal adequada a criação da prole (BARBIERI E BARBIERI, 1981, 1984a).

O período reprodutivo desta espécie é relativamente longo, de setembro a janeiro, coincidindo com o início da época mais quente do ano (BARBIERI E BARBIERI, 1982a, 1983b; RESENDE, 1999; USHIZIMA E BOCK, 2000; BAZZOLI, 2003). Estudos realizados no Pantanal mostraram que as tuviras fêmeas alcançam a sua primeira maturação gonadal com comprimento entre 16 a 18 cm. Já as tuviras entre 24 e 26 cm estão todas maduras sexualmente e em reprodução (RESENDE, 1999). Para BARBIERI E BARBIERI (1982b, 1983ab) o tamanho da primeira maturação gonadal em

tuvira (comprimento em que 50% das fêmeas alcançam a maturação) é de aproximadamente 25 cm. Já acima de 33 cm todas as tuviras fêmeas estão maduras sexualmente. Estudos feitos na Reserva do Lobo, em São Paulo, mostraram que a primeira maturação sexual de *Gymnotus carapo* é atingida aos dois anos de idade, quando se encontra com um comprimento de aproximadamente 25 cm, alcançando um comprimento médio máximo de 54 cm aos 6-7 anos de idade (BARBIERI E BARBIERI, 1983ab, 1984b).

Nos peixes, geralmente é difícil distinguir os sexos pelo exame exterior, especialmente fora da época reprodutiva. Segundo WESTBY (1975) não são conhecidas diferenças sexuais externas na tuvira. Entretanto para alguns biólogos o macho é mais esguio e a fêmea possui corpo mais alto e ventre volumoso. Os sertanejos falam que as tuviras fêmeas são mais amarronzadas, e os machos mais escuros, quase pretos. Segundo RESENDE (1999) a coloração não é um indicador confiável para o estabelecimento do sexo, já que a coloração é bastante variável em função da cor da água onde se encontram. Em experimentos realizados no Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais do IBAMA com *Gymnotus sp.*, não foi possível encontrar correlação positiva com nenhuma das características sexuais secundárias comumente empregadas para caracterizar dimorfismo sexual (USHIZIMA E BOCK, 2000). Esses autores postularam que os indivíduos que apresentam o orifício genital maior que o orifício anal são fêmeas, e os machos apresentariam orifício genital menor que o orifício anal. Com esta metodologia obtiveram uma eficiência de sexagem de 84%. Contudo, este processo de determinação do sexo mostrou-se eficiente somente na época reprodutiva.

Quanto à atividade reprodutiva, às fêmeas de *Gymnotus aff. carapo* apresentam um período de repouso intercalado por períodos de atividade sexual, os quais finalizam com o surgimento de nova prole. No período de repouso, as gônadas estão com tamanho reduzido, contendo apenas células gametogênicas em fases iniciais de desenvolvimento. Com o progresso do ciclo, elas acumulam ovócitos vitelogênicos até alcançarem o pico no momento da reprodução. Em razão do acúmulo dessas células, os ovários sofrem mudanças radicais em sua constituição, alterando sua aparência e peso (BARBIERI E BARBIERI, 1985).

A ocorrência de vários lotes de ovócitos em diferentes graus de desenvolvimento nas fêmeas, encontradas na natureza, revela que a tuvira apresenta uma desova do tipo parcelada, que pode ser antecipada ou atrasada na dependência das condições climáticas (BARBIERI E BARBIERI, 1981, 1985; RESENDE, 1999; RESENDE, 2006). A desova acontece nos meses mais quentes entre folhas, musgos ou raízes de plantas flutuantes. Segundo VAZZOLER (1996), as fêmeas desta espécie teriam uma fecundidade absoluta de 3.000 ovócitos. De acordo com a literatura, os machos escavam o local onde as fêmeas depositam os ovos e cuidam da prole durante a primeira fase do desenvolvimento; contudo os pais costumam comer seus filhotes e o canibalismo torna-se um problema.

Os machos apresentam alterações morfológicas muito discretas nos testículos durante o ciclo reprodutivo, o que não possibilita identificar macroscopicamente os diferentes estágios de maturação. Além disso, a atividade espermatogênica dos machos ocorre durante o ano todo, variando somente de intensidade, que é maior de setembro a janeiro (BARBIERI E BARBIERI, 1982a, 1983b, 1984a).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Contribuir com o estudo morfofisiológico das gônadas e ductos espermáticos de peixes teleósteos Gymnotiformes, utilizando como modelo experimental a espécie *Gymnotus aff. carapo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar as características morfológicas dos testículos e ductos espermáticos de *Gymnotus aff. carapo*;
- Verificar a presença de uma barreira de permeabilidade nos testículos e ductos espermáticos, utilizando a técnica de exclusão do marcador nitrato de lantânio;
- Analisar o perfil eletroforético do conteúdo luminal dos testículos e vias seminais desta espécie, comparando-o com as proteínas do plasma sanguíneo;

- Comprovar a presença de junções oclusivas (base estrutural das barreiras de permeabilidade) mediante a técnica de criofratura e imunomarcção de proteínas presentes nas junções oclusivas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Os exemplares de *Gymnotus aff. carapo* utilizados neste trabalho foram coletados, por pescadores da região, no período de janeiro de 2010 a dezembro 2012 na Lagoa de Cima, Distrito de Ibitioca - Município de Campos dos Goytacazes - Estado de Rio de Janeiro (figura 7).



Figura 7. Mapa mostrando a localização da Lagoa de Cima (21° 46' S e 41° 31' W) no município de Campos dos Goytacazes – RJ. (Fonte: Google Maps).

Os peixes (*Gymnotus aff. carapo*) foram transportados ao laboratório e anestesiados por resfriamento em gelo. Registraram-se alguns dados biométricos (peso corporal, determinado em balança de precisão com sensibilidade de $\pm 0.01g$, e comprimento padrão, desde o focinho até o pedúnculo caudal) de todos os exemplares coletados e, em seguida, os animais foram dissecados de forma de expor o sistema reprodutor. Um total de 126 machos adultos, de peso corporal médio $154.71 \pm 57.3 g$ e comprimento-padrão de $34.9 \pm 4.9 cm$, foram utilizados neste estudo.

4.2 Análise morfológica dos testículos e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo*

Testículos e vias seminais foram cuidadosamente dissecados e fixados em uma solução contendo glutaraldeído 2.5%, paraformaldeído 4% e cloreto de cálcio (CaCl_2) 5mM em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2 - 7.4, durante 24 horas a 4°C. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2 - 7.4 (duas vezes de 10 minutos cada lavagem) e pós-fixadas durante duas hora em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0.1M, pH 7.2 - 7.4, ou em tampão cacodilato de sódio 0.2M contendo ferricianeto (FeCNK) 1,6% e CaCl_2 10mM, no escuro e a temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas no mesmo tampão utilizado na pós-fixação, desidratadas em soluções com concentrações crescentes de acetona [30%, 50%, 70%, 90% (2x), 100% (2x)] e mantidas numa mistura de partes iguais de acetona 100% e resina epóxi (Epon 812) por 24 horas. Após serem infiltradas por um período de 6 horas em resina pura, as amostras foram transferidas para moldes de silicone contendo Epon e polimerizadas em estufa a 60°C por 48 horas.

Os cortes semi-finos (com aproximadamente 1 μm de espessura), obtidos com o auxílio de um ultramicrótomo Reichert Ultracur Ultramicrotome e navalha de diamante, foram corados com azul de toluidina 1%. Os cortes histológicos foram observados em um microscópio ótico Axioplan (Zeiss), ao qual está acoplada uma câmara Canon Power Shot A640, que permite a obtenção de microfotografias digitais. Nos cortes semi-finos de testículo realizou-se também a medição do diâmetro de células germinativas escolhidas ao acaso (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides), utilizando o programa AxioVision Rel 4.8 e aumento de 40x. Os valores foram expressos como média \pm desvio-padrão.

Os cortes ultrafinos (aproximadamente 100nm), obtidos no mesmo ultramicrótomo e com navalha de diamante, foram montados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila 5% durante 30 minutos e citrato de chumbo 0.2% durante 5 minutos, segundo REYNOLDS (1963). Depois de lavadas com água destilada e secadas, as grades foram armazenadas para observação no microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss TEM 900) com aceleração de voltagem de 80 Kv.

4.3 Investigação de uma barreira de permeabilidade nos testículos e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo*

A técnica de exclusão de traçadores de permeabilidade foi utilizada com esta finalidade. O nitrato de lantânio foi escolhido como traçador elétron-denso da barreira de permeabilidade (LÓPEZ et al., 1997). O lantânio se difunde pelo espaço intercelular delineando as junções, mas não ultrapassa as áreas contendo junções do tipo “tight” ou ocludentes. Em nossos ensaios, as amostras de testículos e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo* foram fixadas durante um período de 24 a 48 horas (4°C) em uma solução contendo glutaraldeído 5% e nitrato de lantânio 2% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.4-7.6. Após a fixação, foram feitas duas lavagens (10 minutos cada uma) com o mesmo tampão utilizado na fixação. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0.1M, pH 7.4, ou em tampão cacodilato de sódio contendo ferricianeto (FeCNK) 1.6% e CaCl₂ 10mM, no escuro e a temperatura ambiente, durante 2 horas. Em alguns ensaios foi adicionado nitrato de lantânio 2% ao tampão de lavagem e/ou à solução de pós-fixação.

Após três lavagens (5 minutos cada lavagem) em tampão cacodilato 0.1M, pH 7.4, as amostras foram desidratadas em soluções contendo concentrações crescentes de acetona [30%, 50%, 70%, 90% (2x), 100% (2x)] e logo imersas numa mistura de partes iguais de acetona e Epon, onde permaneceram durante 24 horas. Em uma próxima etapa, esta mistura foi substituída por resina pura e após 6 horas se realizou a inclusão dos tecidos em moldes de silicone contendo Epon. A polimerização desses blocos foi realizada em estufa a 60°C durante 48 horas. Na obtenção e contraste dos cortes, para posterior visualização no microscópio eletrônico de transmissão, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos no último parágrafo do item 4.2.

4.4 Verificação da presença de junções oclusivas - Criofratura

Visando determinar a presença de junções oclusivas nas regiões de exclusão do marcador lantânio, foi utilizada a técnica de criofratura, que permite a observação de réplicas metálicas de membranas biológicas fraturadas. Nas réplicas, as junções ocludentes apresentam um arranjo característico das proteínas intramembranas, o que facilita sua identificação. Para a realização desta técnica, fragmentos de testículos

foram fixados em glutaraldeído 2.5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2-7.4) (24 horas), lavadas duas vezes em tampão cacodilato 0.1M e gradualmente impregnados com glicerol até atingir uma concentração de 30%. Nesta solução permaneceram por 24 horas (4°C). Logo as amostras foram montadas em um suporte adequado, rapidamente resfriadas em Freón 22 (congelado com nitrogênio líquido) e fraturados em um equipamento de criofratura (Freeze etching system BAF060 BAL-TEC) em um estágio de temperatura de -115°C a -130°C. Imediatamente após a fratura, as amostras foram sombreadas com platino-carbono. As réplicas obtidas foram lavadas com hipoclorito de sódio, em água destilada e montadas em grades de cobre. A observação foi realizada em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss TEM 900) com aceleração de voltagem de 80 Kv.

4.5 Análise eletroforética do conteúdo luminal dos testículos e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo*

Outra forma de demonstrar a existência de barreiras sangue - tecido é verificar diferenças na composição do fluido seminal e do plasma sanguíneo. Com este objetivo, testículos e vias seminais foram colocados em uma placa de Petri pequena, separadamente, com 5 ml de tampão fosfato 0.1 M (pH 7.2) e picotados em múltiplos locais de forma a liberar o conteúdo luminal, os quais foram inicialmente centrifugados a 700g durante 20 minutos (centrífuga Hettich Mikro 120) de forma a separar os espermatozoides do fluido seminal. Os sobrenadantes resultantes foram centrifugados a 17.000g por 30 minutos a 4°C. Amostras de sangue, retiradas do coração ou coletadas de vasos sanguíneos presente na cavidade torácica, foram centrifugadas a 17.000g por 30 minutos, obtendo-se assim o plasma sanguíneo. Alíquotas do sobrenadante de todas as amostras foram estocadas em microtubos a -20°C, após a determinação da concentração de proteínas pelo método de BRADFORD (1976). As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro modelo UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu, a λ 595 nm.

As amostras de plasma sanguíneo e de fluidos dos testículos e vias seminais foram submetidas à eletroforese em minigéis de poliacrilamida a 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE segundo LAEMMLI, 1970). Em cada ensaio

eletroforético foi utilizada 30 μ g de proteínas por poço; três partes de cada amostra foram adicionadas a uma parte de tampão de amostra 4x, que contém Tris HCl 0.5M, pH 6.8, glicerol 10%, azul de bromofenol 1% e SDS 2%. A eletroforese foi realizada a aproximadamente 70 V no gel concentrador e aproximadamente 100 V no gel separador, em tampão de eletroforese Tris HCl 25 mM, pH 8.3, glicina 1.4%, SDS 0.1%. A eletroforese termina quando a marcação do azul de bromofenol chega à base do gel. As proteínas contidas nos géis foram reveladas com azul brilhante de Coomassie R-250 (REISNER, 1984) durante 12 horas e, posteriormente, os minigéis foram lavados com água fervente, por cinco vezes, até o gel ficar incolor. Os géis foram fotografados com câmera digital (Canon Digital Rebel XT) obtendo imagens coloridas ou utilizando um scanner comercial (HP Photosmart). Os géis também foram corados mediante a técnica de PAS (ácido periódico de Schiff), segundo GANDER, 1984. Resumidamente, os géis foram imersos em uma solução contendo 25% de isopropanol e 10% de ácido acético, permanecendo nesta solução durante toda a noite. Depois foram tratados com 10% de ácido acético durante 30 min. e, em seguida, com 0.5% de ácido periódico durante 2 horas, a 4°C. A solução de ácido periódico foi removida e incubou-se o gel no reagente de Schiff durante 2 horas a 4°C. O reagente de Schiff foi removido e os géis foram embebidos em 10% de ácido acético durante 30 min. e, subsequentemente, armazenadas em água destilada. Bandas de coloração magenta, que indicam a presença de glicoproteínas, foram observadas.

Análise densitométrica: As massas moleculares relativas das proteínas contidas em cada amostra foram calculadas por comparação da sua mobilidade eletroforética (Rf) com as proteínas de massa molecular conhecida, que migraram no mesmo gel. A quantidade relativa das diversas proteínas foi determinada por densitometria, usando o programa *Gel-perfect*, a partir de imagens em cinza de géis obtidos em um scanner comercial, a 400 dpi. Este programa calcula a mobilidade relativa de cada banda e a área ocupada por ela, fornecendo também uma representação diagramática das bandas protéicas e de sua concentração relativa em relação ao total de proteínas por canal (BOZZO E RETAMAL, 1991; RETAMAL et al., 2000).

4.6 Imunomarcção de ocludina e claudina. Detecção por *Western Blotting*

A detecção das proteínas ocludina e claudina, constituintes das junções oclusivas, foi realizada através da técnica de *Western blotting*. As amostras de proteínas do testículo e da via seminal foram submetidas à eletroforese em minigéis de poliacrilamida a 12% na presença de SDS. Foi aplicado um volume total de 60 µl de amostra em cada poço (poço 1: proteínas testiculares; poço 2: proteínas da via seminal; poço 3: proteínas testiculares previamente incubadas com anticorpo anti-occludina ou anti-claudina; poço 4: proteínas da via seminal previamente incubadas com anticorpo anti-occludina ou anti-claudina; poço 5: anticorpo anti-occludina ou anti-claudina). As proteínas foram separadas eletroforéticamente por aproximadamente 3 horas, à voltagem de aproximadamente 100 V, contendo os marcadores de peso molecular pré-corados SDS-PAGE (*Bio-Rad Laboratories*, 161-0318) e, em seguida, foi realizada a transferência dos perfis proteicos para membranas de nitrocelulose. Os géis foram transferidos durante 3 horas, a 100 V e 40 mA, no sistema de transferência úmido da Bio Rad. Uma vez terminada a transferência de proteínas, os sítios não específicos nas membranas foram bloqueados com leite mólico 5%, Triton X 0.1% em tampão fosfato-salino (PBS) por 1 hora, no escuro. As proteínas ocludina e claudina foram imunodetectadas através da incubação com anticorpo anti-occludina (Anticorpo de camundongo anti-occludina conjugado a FITC; *invitrogen*, 33-1511) e anticorpo policlonal anti-claudina (Anticorpo policlonal de coelho para claudina-11 de humano; *Santa Cruz Biotechnology*, sc-28669), respectivamente, ambos diluídos em 1:1000 em PBS contendo leite mólico 3%, durante toda noite, a 4°C. Após esta etapa, foram feitas várias lavagens em PBS e leite mólico 5%, e as membranas que foram incubadas com o anticorpo anti-occludina já estavam prontas para serem visualizadas com luz ultravioleta (UV).

As membranas que foram incubadas com o anticorpo anti-claudina foram incubadas com anticorpo IgG anti-coelho conjugado com alexa flúor (Anticorpo IgG anti-rabbit conjugado com alexa flúor 488; *Life Technologies*, A11008) a uma diluição de 1:1000 em PBS e 5% de leite mólico por 1 hora. Após três lavagens de 10 minutos cada, em PBS contendo leite mólico 5%, e última lavada em PBS puro por 20 minutos, as membranas foram visualizadas mediante luz UV.

5. RESULTADOS

5.1 Análise morfológica dos testículos e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo*

Os testículos de *Gymnotus aff. carapo* são órgãos pares, consistentes e de formato ovalado. Encontram-se posicionados ventralmente na cavidade abdominal, próximos à extremidade caudal do conjunto visceral, e estão presos à cavidade abdominal pelo mesórquio. Da região cranial de ambos os testículos emergem longos ductos espermáticos independentes, de coloração esbranquiçada, os quais desembocam na papila urogenital, localizada na região imediatamente posterior ao ânus (região ventro-cranial) (figura 8).

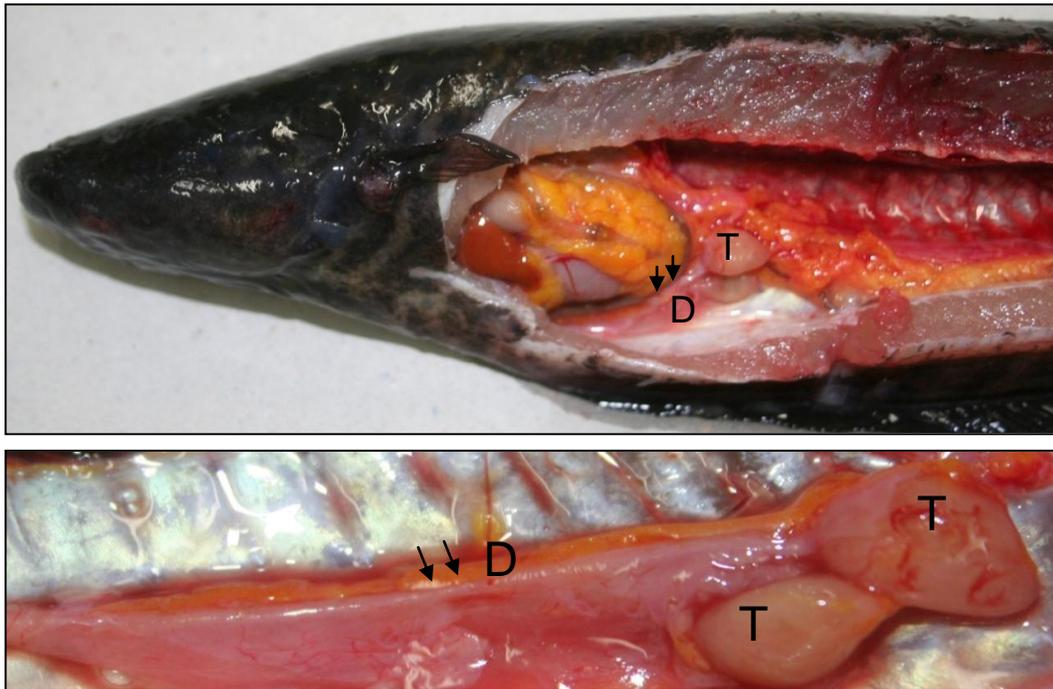


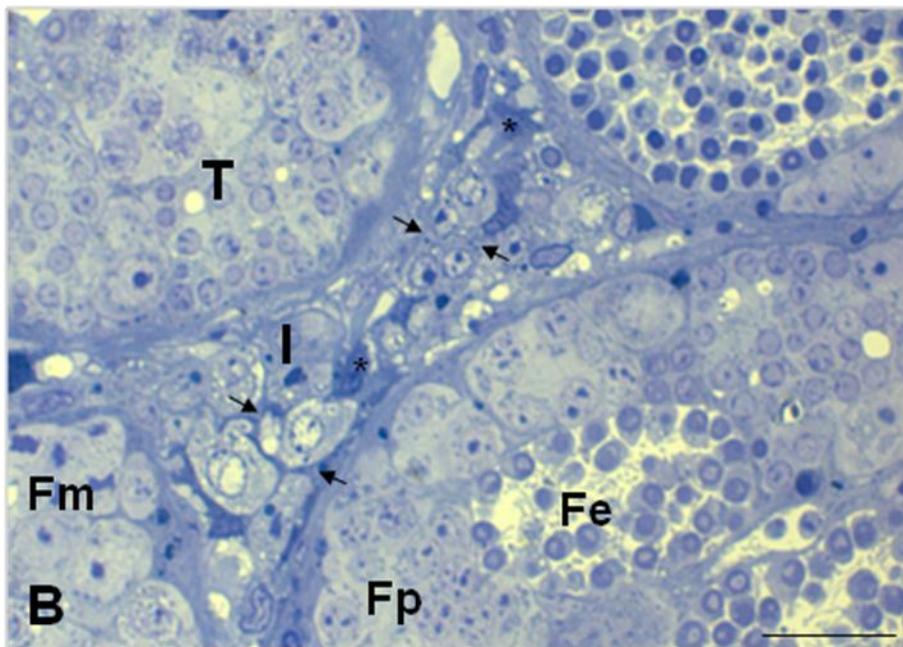
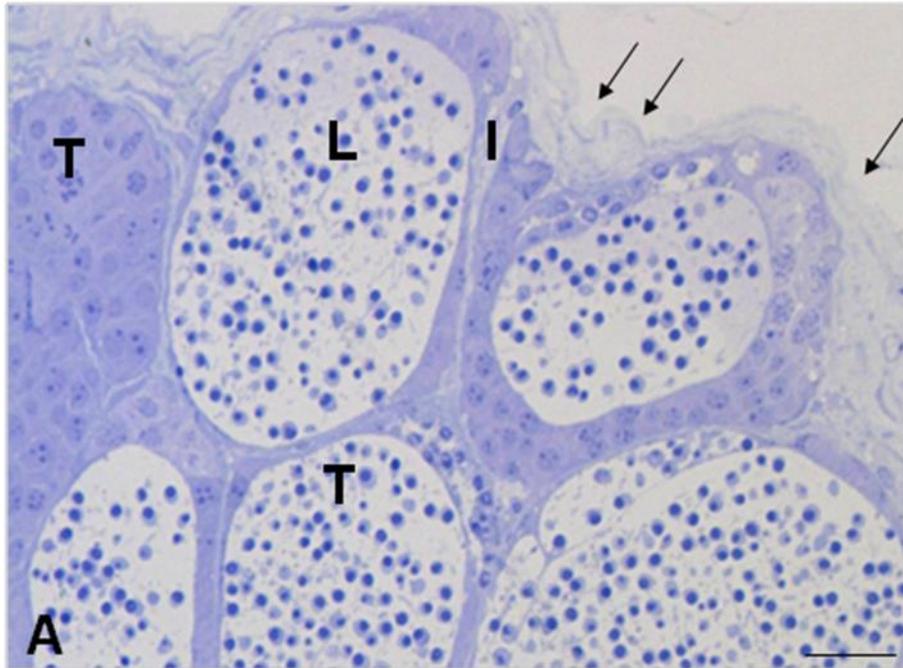
Figura 8. Secção lateral da cavidade celomática de *Gymnotus aff. carapo* com exposição dos testículos (T) e ductos espermáticos (D).

Através das análises microscópicas visualizou-se que os testículos de *Gymnotus aff. carapo* são revestidos por uma fina cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, que se projeta para o interior do órgão formando finos septos, que se ramificam e delimitam os compartimentos intersticial e tubular do testículo (pranchas 1 e 2). No compartimento intersticial observaram-se entre os elementos celulares, fibrilares e vasculares próprios do tecido conjuntivo, as células de Leydig. Estas células, responsáveis pela biossíntese de hormônios esteróides, encontram-se, geralmente, em pequenos grupos próximos aos vasos sanguíneos. Apresentam formato oval ou arredondado e um núcleo ligeiramente excêntrico, com um nucléolo proeminente. Ao nível ultraestrutural, observou-se um retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e numerosas mitocôndrias com cristas tubulares no citoplasma destas células. Compondo o epitélio dos túbulos seminíferos observaram-se células da linhagem germinativa e células de Sertoli. Estas células, de formato irregular, apresentam núcleo heterocromatínico de forma variável (pleomórfico) e um nucléolo proeminente (prancha 2). No citoplasma destas células observam-se ribossomos, membranas de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, lisossomos, vacúolos digestivos contendo corpos residuais, entre outras estruturas. Estas células localizam-se na periferia dos cistos e seus finos prolongamentos se estendem entre as células germinativas, envolvendo-as, formando o cisto. Células de Sertoli adjacentes, do mesmo ou de diferentes cistos, se interconectam através de diferentes tipos de junções celulares. O compartimento tubular está delimitado por uma lâmina basal característica e células mióides peritubulares (Pranchas 1 e 2).

Como em outros teleósteos, o cisto é a unidade básica do epitélio espermatogênico em *Gymnotus aff. carapo*. Esta estrutura corresponde a uma célula germinal ou a clones isogênicos de células germinais rodeados pelos prolongamentos das células de Sertoli, os quais formam a parede do cisto. Em cada cisto, as células germinativas se encontram em estágio similar do processo espermatogênico (Prancha 3).

A espermatogênese desta espécie exhibe as três fases clássicas deste processo: a fase espermatogonial, na qual as espermatogônias tipo A, por sucessivas divisões mitóticas com citocinese incompleta, darão origem às espermatogônias tipo B; a fase

PRANCHA 1



Prancha 1

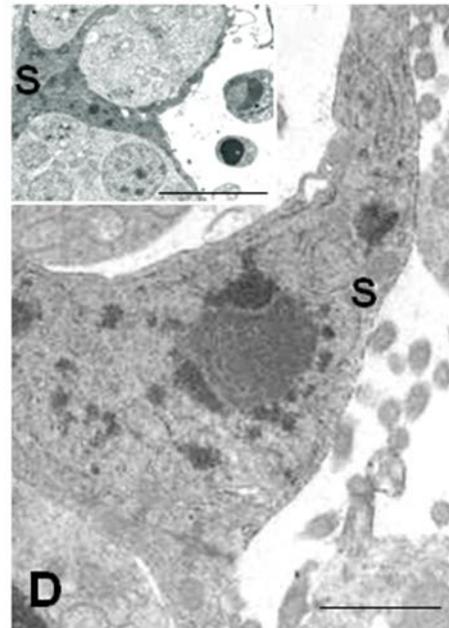
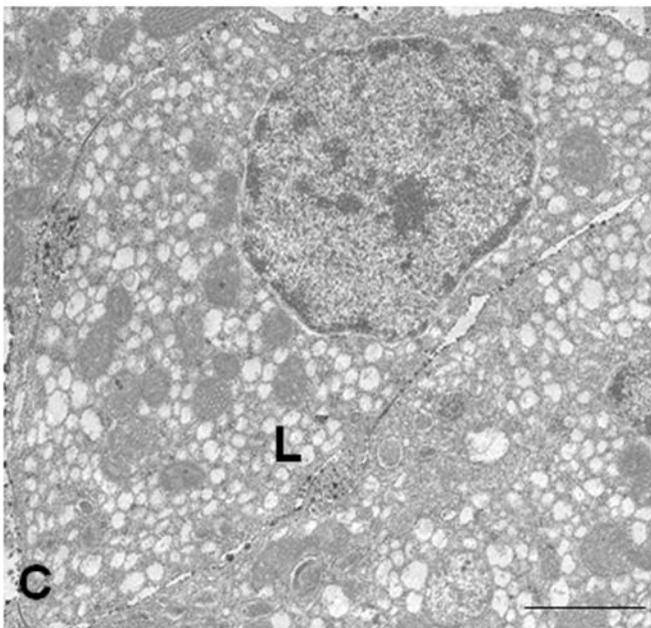
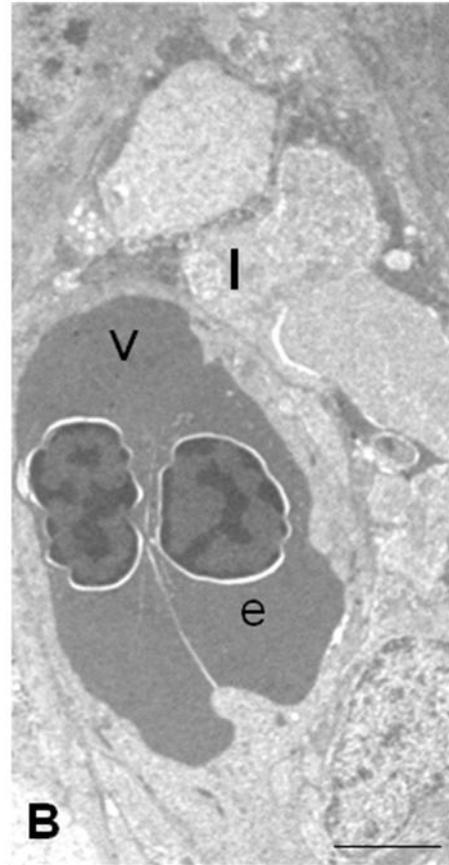
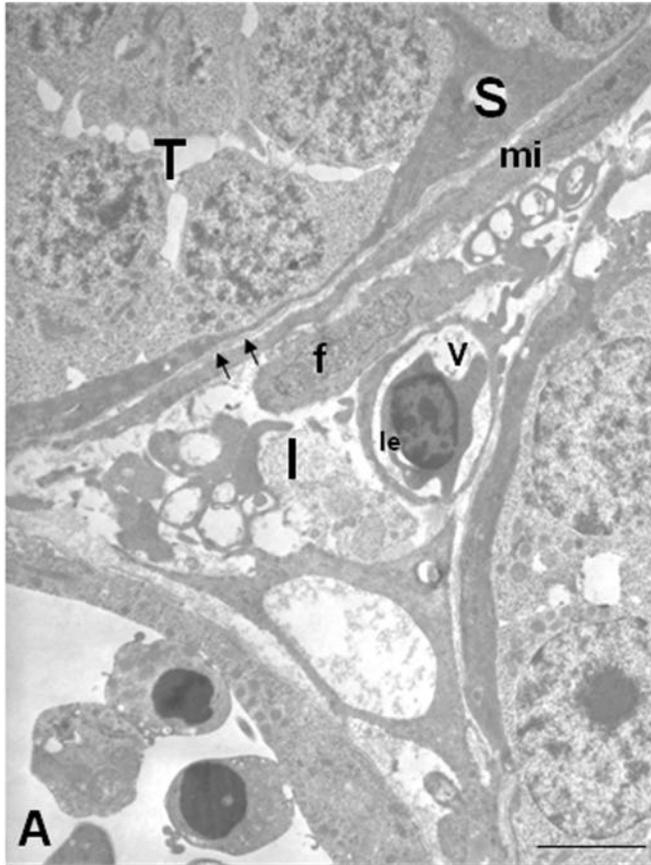
Figura A. Corte semi-fino de testículo de *Gymnotus* aff. *carapo*, no qual visualiza-se a túnica albugínea (setas), que envolve e se projeta para o interior da gônada, formando septos que delimitam os compartimentos intersticial (I) e tubular (T) do testículo. Luz tubular (L).

Barra = 10 μ m - Coloração: azul de toluidina

Figura B. Corte semi-fino de testículo de *Gymnotus* aff. *carapo* mostrando os compartimentos tubular (T) e intersticial (I). No compartimento intersticial observam-se elementos do tecido conjuntivo, como vasos sanguíneos (*) e células de Leydig (L - setas). No compartimento tubular podem ser observados espermatocistos contendo células da linhagem germinativa em diferentes fases da espermatogênese (fase proliferativa [Fp], fase meiótica [Fm] e de diferenciação ou espermiogênica [Fe]).

Barra = 1 μ m - Coloração: azul de toluidina

PRANCHA 2



Prancha 2

Figuras A – B. Cortes ultrafinos de testículo, mostrando com maior aumento os compartimentos tubular (T), intersticial (I) e vascular (V) da gônada. No compartimento intersticial são observados elementos do tecido conjuntivo (fibroblastos - f); no compartimento vascular observam-se eritrócitos nucleados (e) e leucócitos (le). No compartimento tubular (T) visualiza-se uma célula de Sertoli (S) e seu prolongamento, envolvendo um grupo de células germinativas. Limitando o cisto, observam-se a lâmina basal (setas) e as células mióides peritubulares (mi).

Barra_{A,B} = 2 μ m

Figura C. Destaca-se uma célula de Leydig. No citoplasma desta célula, mitocôndrias e um retículo endoplasmático liso bem desenvolvido.

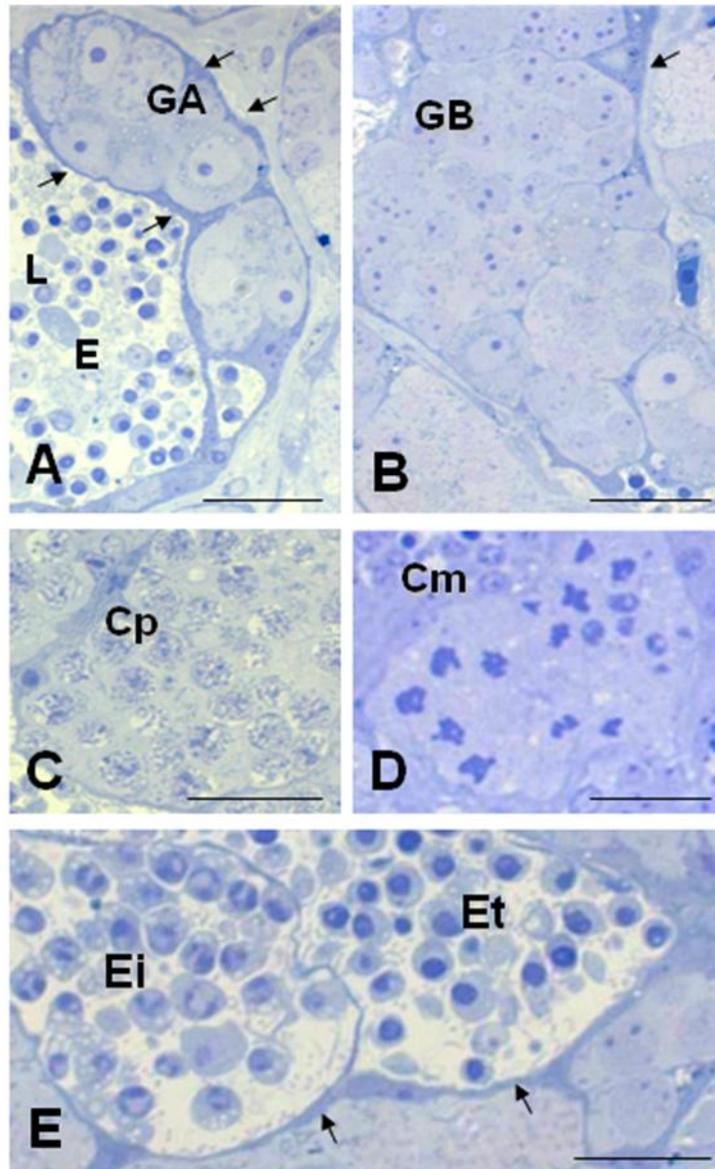
Barra = 1 μ m

Figura D. Ultraestrutura de uma Célula de Sertoli. Estas células apresentam um formato irregular, núcleo pleomórfico com nucléolo evidente, e heterocromatina difusa. No detalhe, uma Sertoli envolvendo grupos de células germinativas.

Barra = 1 μ m

Barra = 2 μ m (insert)

PRANCHA 3



Prancha 3

Figura A. Corte semi-fino de testículo mostrando cistos contendo espermatogônias tipo A (GA) em estreita associação com células de Sertoli (setas); os prolongamentos destas células formam a parede dos cistos. Observa-se também um grupo de espermátides (E) na luz do túbulo espermatogênico (L).

Barra = 2 μ m - Coloração: azul de toluidina

Figura B. Corte semi-fino de testículo mostrando cistos contendo um grupamento isogênico de espermatogônias tipo B (GB), envolvido por células de Sertoli (setas).

Barra = 2 μ m - Coloração: azul de toluidina

Figura C. Corte semi-fino de testículo mostrando um cisto contendo células em prófase meiótica (Cp) (espermatócito primário).

Barra = 1 μ m - Coloração: azul de toluidina

Figura D. Corte semi-fino de testículo mostrando espermatócitos na etapa de metáfase (Cm) da meiose I.

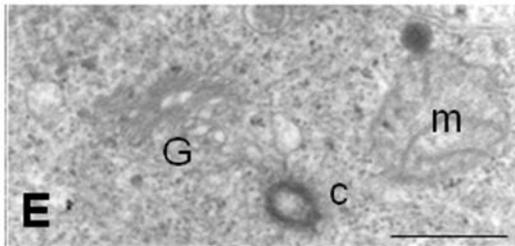
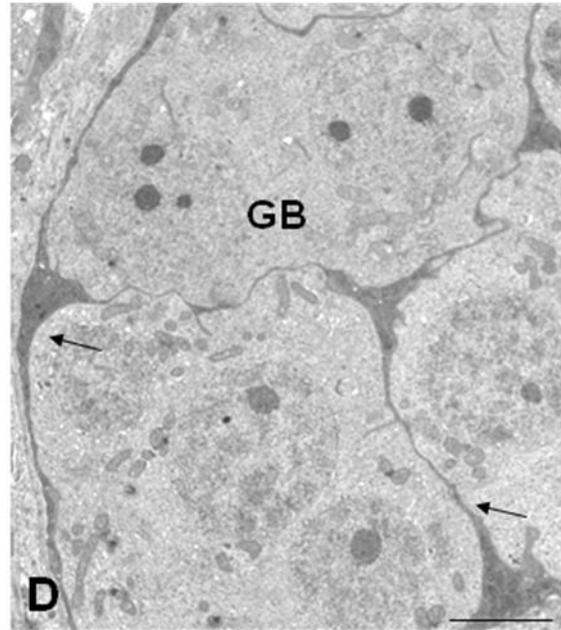
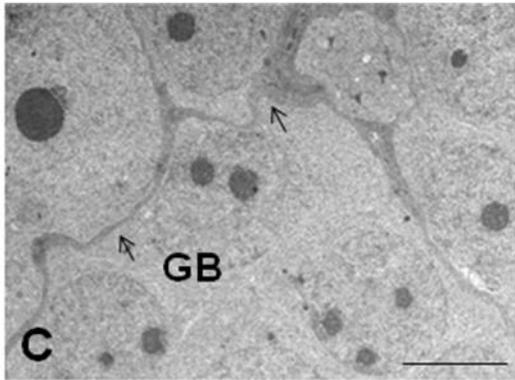
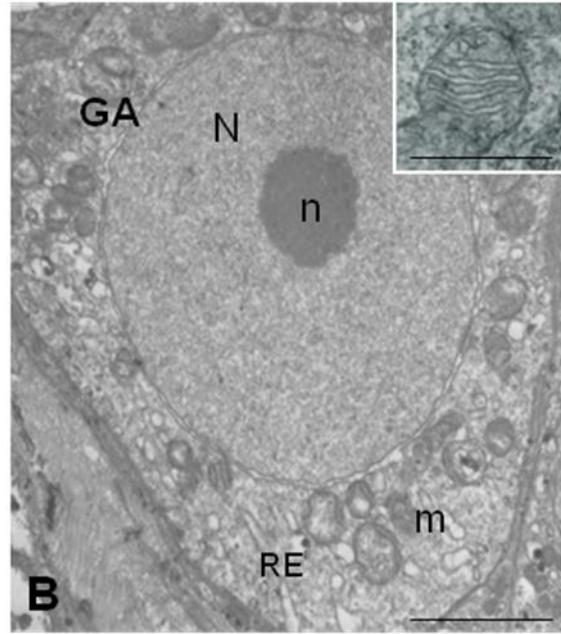
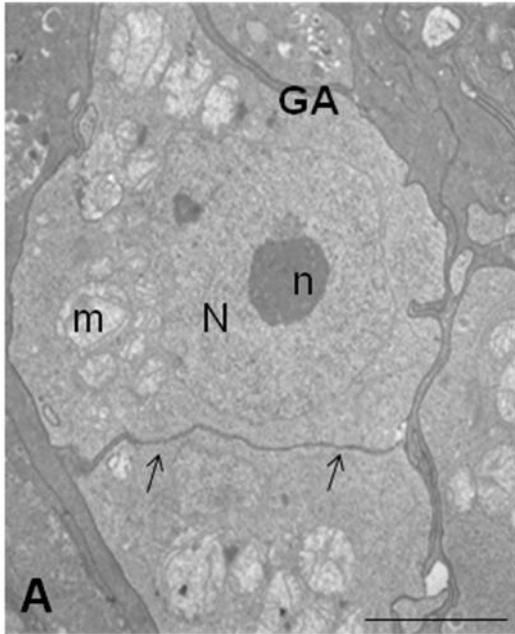
Barra = 2 μ m - Coloração: azul de toluidina

Figura E. Corte semi-fino de testículo mostrando espermátides em fase inicial (Ei) e tardia (Et) do processo espermiogênico. As setas assinalam os prolongamentos das células de Sertoli.

Barra = 1 μ m - Coloração: azul de toluidina

meiótica, durante a qual os espermatócitos darão origem a espermátides haplóides e a fase de diferenciação ou espermiogênica. As espermatogônias tipo A são as maiores células da linhagem espermatogênica, medindo $14.4 \pm 2.3 \mu\text{m}$. Estas células, de forma arredondada ou oval, apresentam um núcleo grande, central, eucromatínico, com um nucléolo proeminente. No citoplasma observam-se, entre outras organelas, mitocôndrias distribuídas aleatoriamente, algumas das quais apresentavam um material elétron-denso associado. Estas células foram encontradas ao longo de todo o túbulo seminífero e, geralmente, estão individualmente envolvidas pelos prolongamentos da célula de Sertoli (Pranchas 3 e 4). As espermatogônias tipo B são células menores que as anteriores, medindo $7.6 \pm 1.9 \mu\text{m}$. Estas células possuem um núcleo esférico e proeminente, apresentando comumente mais de um nucléolo. Além disso, podem ser encontradas em grupos de até dezoito células. Em cortes ultrafinos de testículo foi observado grupos de espermatogônias tipo B envolvidos pelos prolongamentos da célula de Sertoli, formando os cistos espermatogênicos (Pranchas 3 e 4). Devido à citocinese incompleta, as espermatogônias tipo B apresentam-se unidas por pontes citoplasmáticas, o que facilita o sincronismo do processo espermatogênico. As espermatogônias B se dividem para dar origem aos espermatócitos. Estas células representam a fase meiótica do processo espermatogênico e são facilmente identificadas devido aos diferentes graus de compactação dos seus cromossomos durante a meiose (Prancha 3). Estas células medem aproximadamente $7.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$. Divisões mitóticas das espermatogônias secundárias levam a formação dos espermatócitos primários pré-leptotênicos. Nesta etapa ainda é possível observar o nucléolo em algumas células. Espermatócitos primários em prófase ou metáfase meiótica foram as etapas mais frequentemente observadas. Enquanto avança a prófase meiótica, a cromatina começa a se condensar e organizar. No estágio de zigóteno/paquítenu observa-se o complexo sinaptonêmico, estrutura que representa a união dos cromossomos homólogos. Nos espermatócitos em metáfase, os cromossomos estão muito condensados e localizam-se na região equatorial da célula (Pranchas 3 e 5). Durante a meiose, os espermatócitos permanecem conectados pelas pontes citoplasmáticas. Ao completarem a meiose I, os espermatócitos primários darão origem aos espermatócitos secundários, que são raros de serem detectados porque

PRANCHA 4



Prancha 4

Figuras A – B. Cortes ultrafinos de testículo mostrando espermatogônias tipo A (GA) rodeadas pelos prolongamentos das células de Sertoli (setas). Estas células, de forma arredondada ou ovalada, possuem um núcleo (N) grande, esférico, com nucléolo (n) único e evidente. No citoplasma, ribossomos, membranas retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias (m) espalhadas aleatoriamente. No “insert”, observa-se uma mitocôndria a maior aumento.

Barra _{A,B} = 500nm

Barra = 500nm (insert)

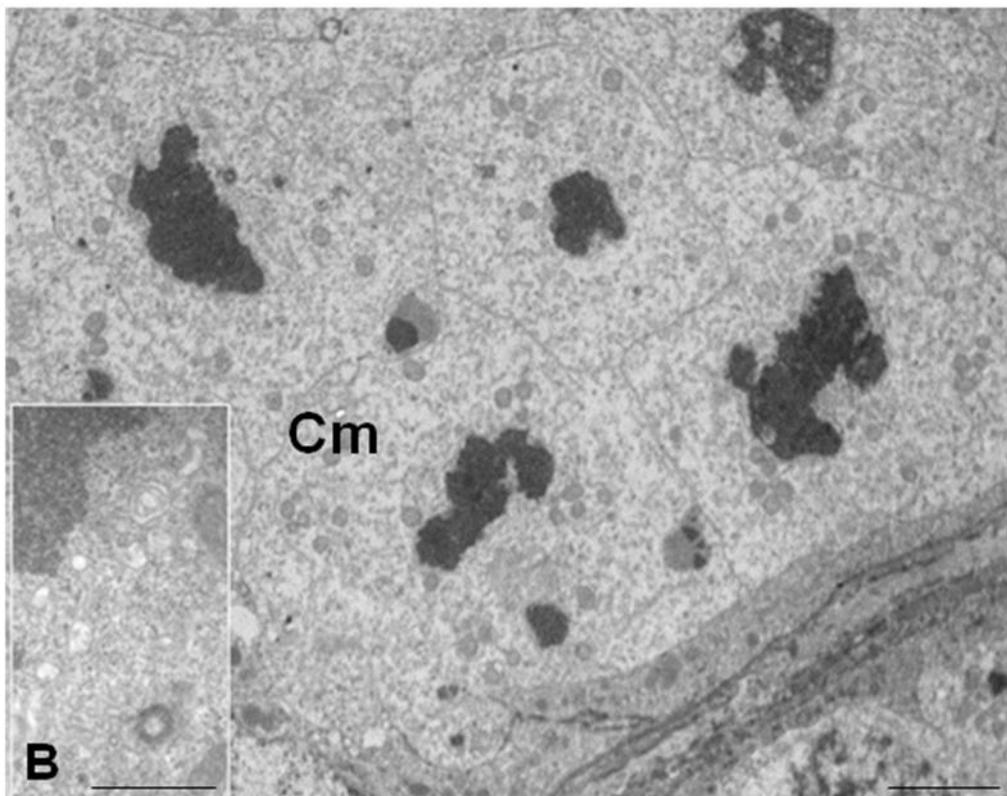
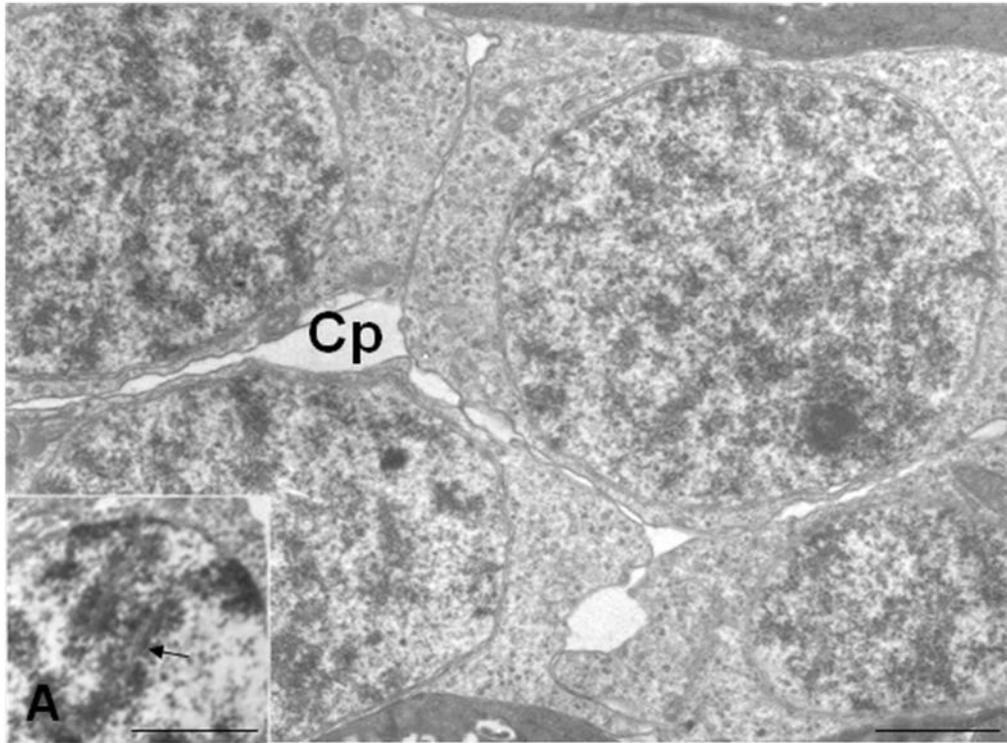
Figuras C – D. Cortes ultrafinos de testículo de *G. aff. carapo* mostrando espermatogônias do tipo B (GB) envolvidas pelos prolongamentos das células de Sertoli (setas).

Barra _{C,D} = 2 μ m

Figura E. Detalhe do citoplasma de uma espermatogônia tipo A, onde visualizam-se o complexo de Golgi (G), o centríolo (c) e uma mitocôndria (m).

Barra = 1 μ m

PRANCHA 5



Prancha 5

Figura A. Eletromicrografia mostrando espermatócitos em prófase meiótica - etapa de leptóteno (Cp). No "insert" um espermatócito na etapa paquíteno, onde visualiza-se o complexo sinaptonêmico (seta), estrutura que representa a união dos cromossomos homólogos.

Barra = 1 μm

Barra = 1 μm (insert)

Figura B. Eletromicrografia mostrando espermatócitos em metáfase (Cm), etapa em que os cromossomos estão muito condensados e localizam-se na região equatorial da célula. No "insert" observa-se um centríolo no citoplasma destas células.

Barra = 2 μm

Barra = 1 μm (insert)

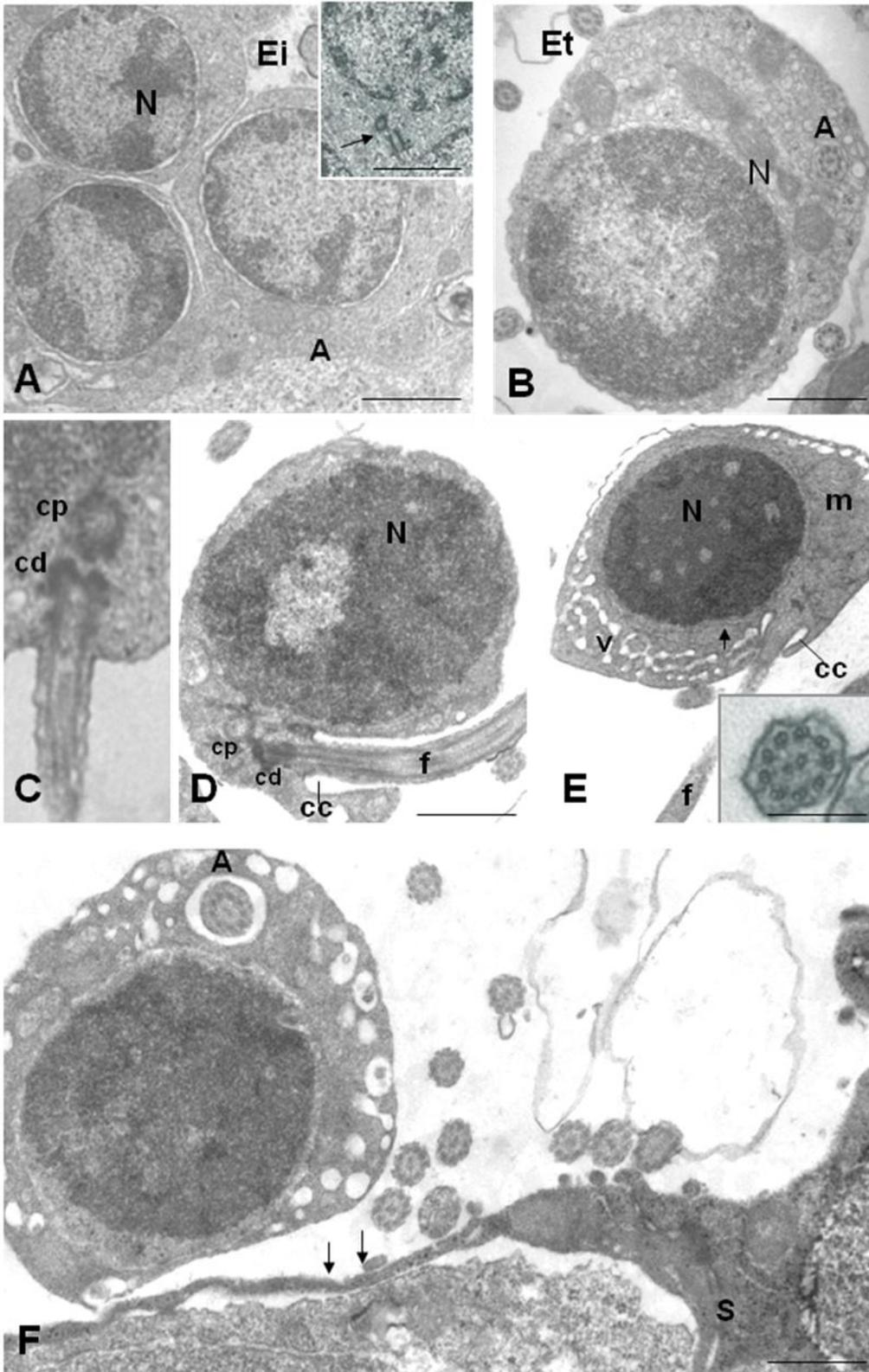
logo entram na meiose II. Os espermatócitos secundários apresentam o núcleo com a cromatina condensada em um dos pólos, o que lhes conferem aspecto de meia lua.

Ao final da meiose II, os espermatócitos secundários darão origem a células haplóides, as espermatídes. Estas células, de forma aproximadamente esférica, são pequenas, medindo aproximadamente $2.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$, e constituem uma população heterogênea - dado os diferentes graus de condensação que apresenta a cromatina nuclear durante a espermiogênese. Durante a espermiogênese, as espermatídes experimentam drásticas modificações morfológicas, dentre elas a perda de parte do material citoplasmático, condensação da cromatina, formação do flagelo, dando assim origem a espermatozóides com características específicas da espécie. Neste trabalho foram identificadas pelo menos dois tipos de espermatídes: as espermatídes iniciais (em fase inicial do processo espermiogênico) e as espermatídes tardias (em fase final do processo espermiogênico), as quais apresentaram diferentes graus de condensação da cromatina nuclear. Tanto nas espermatídes iniciais quanto nas tardias foi possível visualizar o axonema, que se desenvolve paralelo ao núcleo, sem rotação nuclear (Prancha 3 e 6).

Os espermatozóides de *Gymnotus aff. carapo*, como em outras espécies de teleósteos, apresentam as regiões da cabeça, da peça intermediária e do flagelo. Na cabeça observou-se um núcleo esférico com cromatina homogeneamente condensada, que ocupa quase a totalidade da região da cabeça. Não se observou a presença de acrossoma nos espermatozóides desta espécie. Na base do núcleo, o envelope nuclear forma uma depressão chamada fossa nuclear. Na peça intermediária observou-se o complexo centriolar, formado pelos centríolos proximal (que dá origem a peça intermediária) e distal (que dá origem ao flagelo). Também foram observadas diversas vesículas agrupadas na periferia, próximas à membrana plasmática, e mitocôndrias distribuídas irregularmente pelo citoplasma, além de um curto canal citoplasmático. O flagelo, único - paraxial, apresentou uma típica estrutura axial formada por nove pares de microtúbulos periféricos mais um par central, a qual esta rodeada pela membrana flagelar (Prancha 6).

Em associação com as células germinativas, observaram-se células de Sertoli, envolvendo-as individualmente, como ocorre com as espermatogônias tipo A, ou

PRANCHA 6



Prancha 6

Figuras A – B. Eletromicrografias mostrando a ultraestrutura de espermátides em diferentes etapas do processo espermiogênico - fase inicial (Ei) e outra mais tardia (Et) - as quais apresentam a cromatina em graus diferentes de condensação. No “insert” visualizam-se os centríolos proximal e distal (seta). Núcleo (N), axonema (A).

Barra_{A,B} = 1 μ m

Barra = 2 μ m (insert)

Figura C. Imagem de maior aumento dos centríolos proximal e distal de uma espermátide, os quais dão origem a peça intermediária e ao flagelo, respectivamente.

Barra = 2 μ m

Figuras D – E – F . Eletromicrografias de espermatozóides no lúmen tubular. Observa-se a região da cabeça, com um núcleo (N) apresentando uma cromatina altamente condensada, uma peça intermediária curta e um flagelo (f) em posição lateral e paralelo ao núcleo. Mais detalhes da estrutura espermática podem ser observados, como o canal citoplasmático curto (cc) mitocôndrias (m), complexo centriolar que é formado pelos centríolos proximal (cp) e distal (cd) e algumas vesículas (v) agrupadas próximas a membrana plasmática. No “insert” observa-se o axonema (A) do flagelo, com o clássico padrão axial 9+2. Fossa nuclear (seta). Em F observa-se parte de uma célula de Sertoli (S), e seus prolongamentos (setas).

Barra_{D,E,F} = 1 μ m

Barra = 500nm (insert)

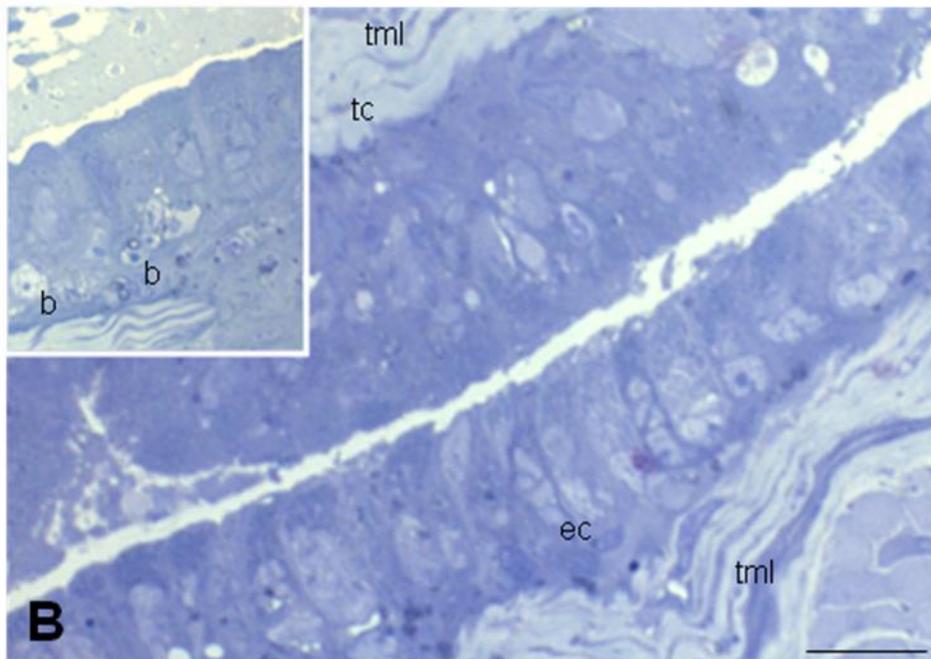
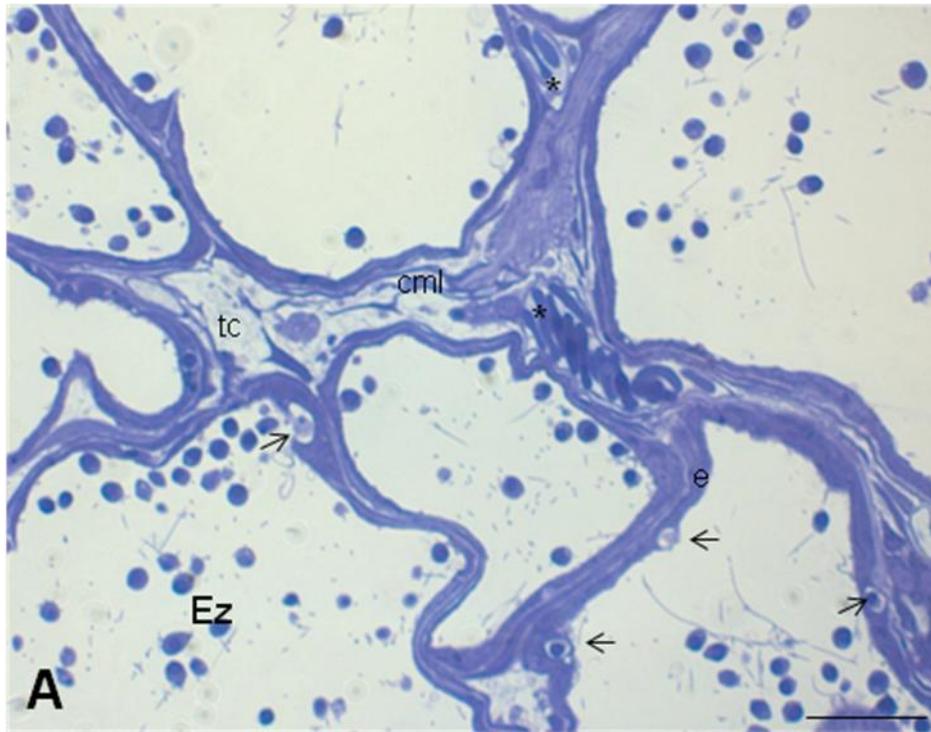
formando cistos com grupos de células germinais, como é observado com os demais tipos celulares (Pranchas 3 e 4). Além de participar da formação do cisto, as células de Sertoli têm propriedades fagocíticas. No citoplasma destas células observaram-se, além de lisossomos, vacúolos fagocíticos e corpos residuais de células germinais. No final do processo espermatogênico, o contato íntimo entre células germinativas e as células de Sertoli é quebrado pelo rompimento da parede do cisto; as pontes citoplasmáticas que unem as espermatídes se desfazem e elas são liberadas individualmente para o lúmen do túbulo. O rompimento do cisto contendo células em estágio de espermatíde e a presença de espermatídes e espermatozóides no lúmen do túbulo seminífero sugere que a espermatogênese em *Gymnotus aff. carapo* seja do tipo semicística.

No ducto espermático de *Gymnotus aff. carapo* foram identificadas duas regiões morfológicamente distintas: região proximal e região distal. A região proximal do ducto é formada por um epitélio simples de células baixas, limitado pela lâmina basal e células mióides peritubulares. Mais externamente se visualiza tecido conjuntivo e tecido muscular liso. No lúmen do ducto observam-se abundantes espermatozóides. Durante as análises do ducto espermático proximal detectou-se espermatofagia nas amostras estudadas. Já a porção distal do ducto espermático é formada por um epitélio simples do tipo colunar, no qual se observaram células principais e basais apoiadas numa lâmina basal característica. Mais externamente, tecido conjuntivo e células musculares lisas (Prancha 7).

Nas eletromicrografias expostas na prancha 8 observa-se o epitélio da região proximal do ducto espermático. As células apresentaram, na região apical, finos prolongamentos que se dirigem em direção ao lúmen do ducto. Na sequência, um espermatozóide envolto pelos prolongamentos citoplasmáticos das células epiteliais e nas figuras seguintes observam-se vacúolos fagocíticos (fagossomos) e, possivelmente, corpos residuais. Estes dados sugerem que esta região pode estar envolvida na reabsorção e fagocitose de elementos presentes no ducto, e entre eles espermatozóides provavelmente danificados.

O conduto deferente distal é formado por um epitélio simples de células colunares, com núcleo ovóide localizado no terço basal da célula; no citoplasma um

PRANCHA 7



Prancha 7

Figura A. Corte semi-fino da região proximal da via seminal, que é formada por um epitélio simples de células baixas (e), tecido conjuntivo (tc) e células musculares lisas (cml). Muitos espermatozoides (Ez) no lúmen (Lu) deste ducto. Observa-se, ainda, espermatozoides fagocitados pelas células epiteliais (setas). Vasos sanguíneos (*).

Barra = 2 μ m

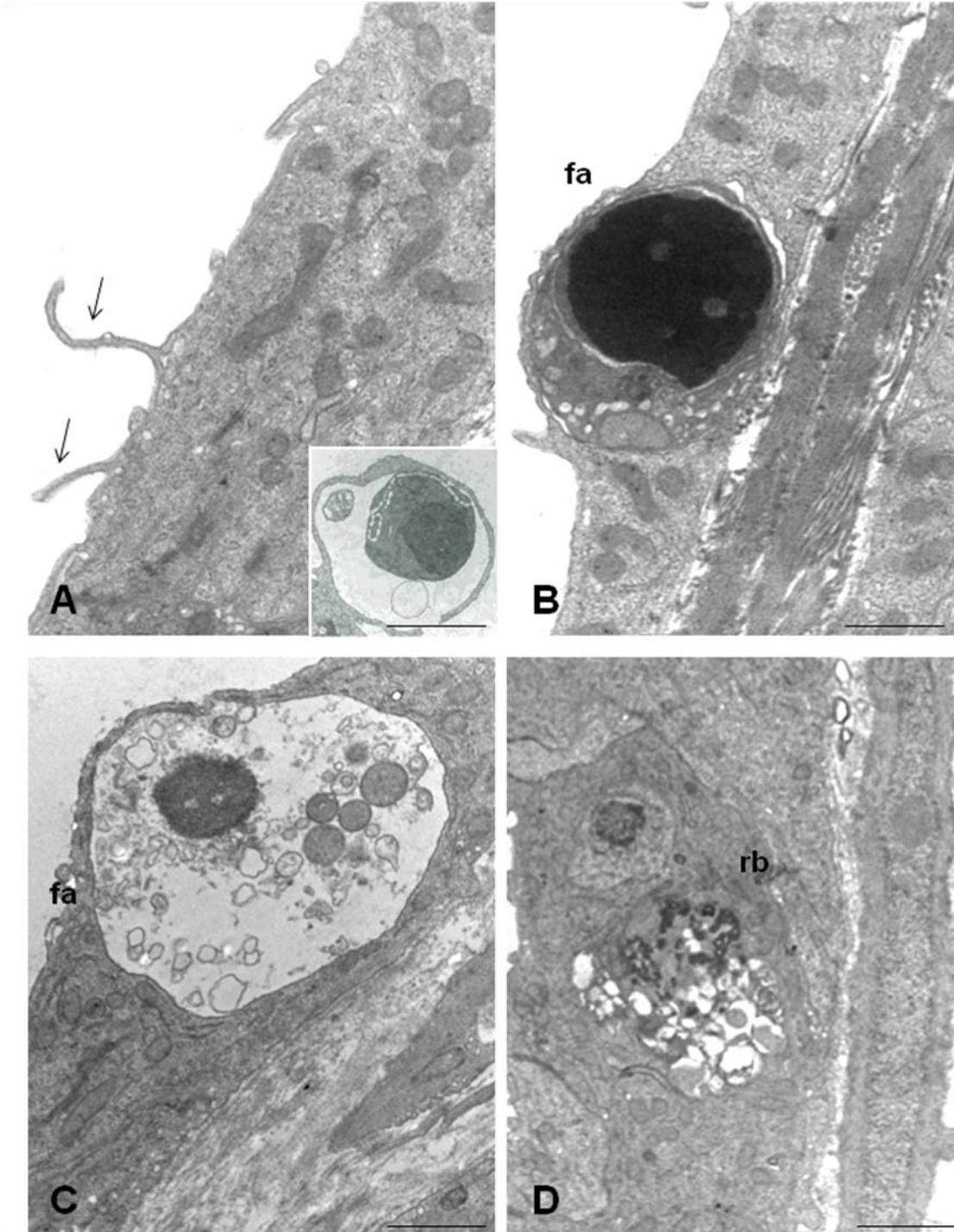
Coloração: azul de toluidina

Figura B. Corte semi-fino da região distal da via seminal, que é formada por um epitélio simples colunar (ec), tecido conjuntivo (tc) e tecido muscular liso (tml). Nesta região não foi observada fagocitose de espermatozoides. No "insert" observa-se células basais (b) entre as células colunares.

Barra = 2 μ m

Coloração: azul de toluidina

PRANCHA 8



Prancha 8

Figuras A – B – C – D. Eletromicrografias mostrando uma sequência de fagocitose pelas células epiteliais que formam o ducto. Em A, pequenos prolongamentos citoplasmáticos (setas) das células epiteliais em direção ao lúmen. No “insert”, uma célula germinal envolta completamente pelos prolongamentos das células epiteliais. Em B, um fagossomo (fa); em C a célula sendo digerida e, por fim, em D, corpo residual (rb) da célula fagocitada.

Barra_{A,B} = 500nm

Barra = 500nm (insert)

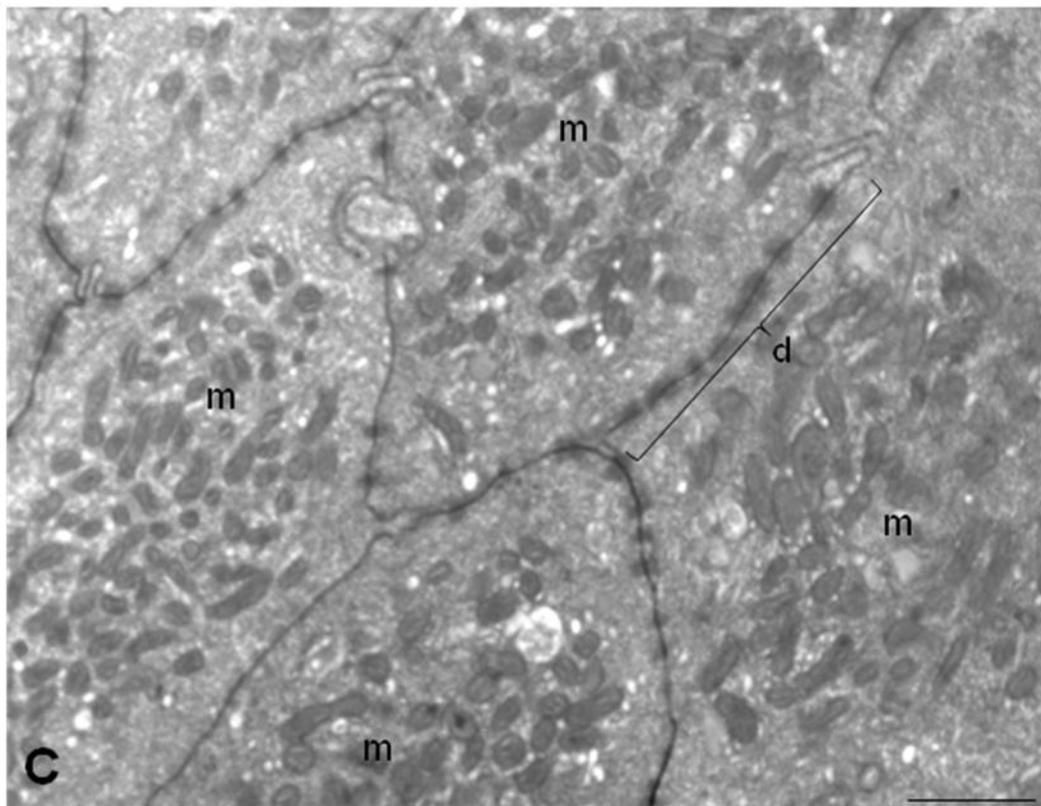
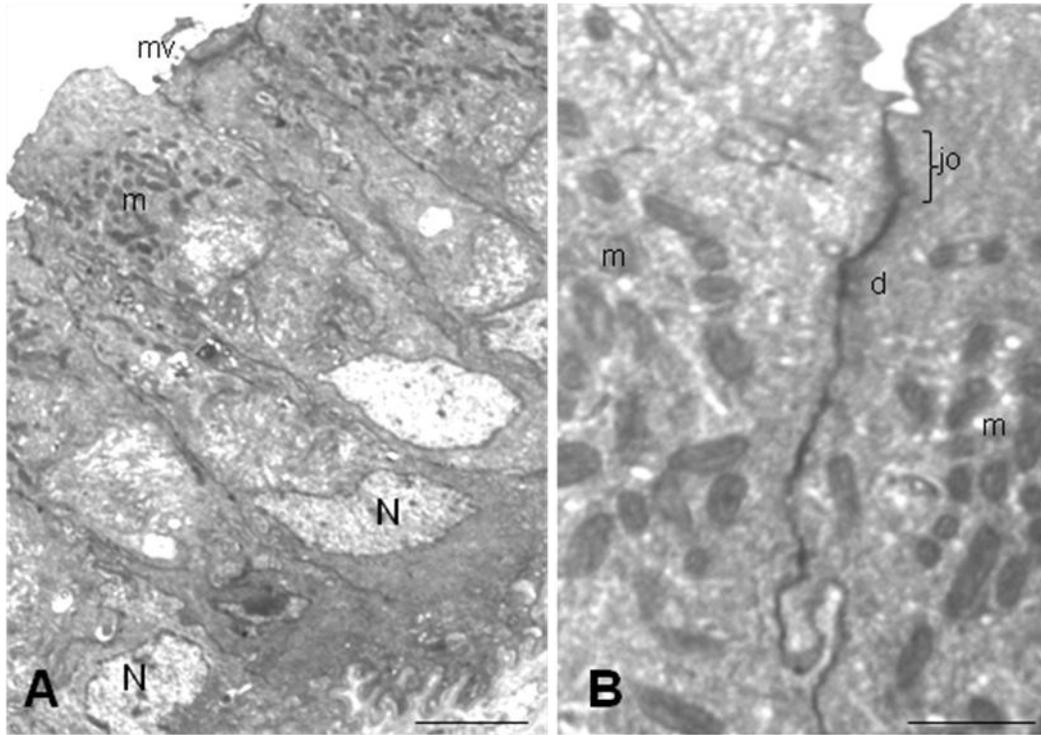
Barra_{C,D} = 1µm

complexo de Golgi bem desenvolvido e abundantes mitocôndrias foram observados na região apical destas células. Entre as células principais observaram-se células basais. Complexos de união (junções oclusivas, de adesão e desmossomos) e interdigitações da superfície lateral da membrana plasmática foram observados entre as células principais (Prancha 9).

5.2 Investigação de barreiras de permeabilidade nos testículos e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo*

O traçador de espaços intercelulares (nitrato de lantânio) permitiu verificar a existência de uma barreira de permeabilidade nos testículos e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo*, ainda não descrita nesta ordem. No testículo, o marcador penetrou nos túbulos seminíferos pelos espaços intercelulares, rodeou e apareceu no interior de cistos contendo grupos de espermatogônias e espermátócitos em estágios iniciais da meiose (Prancha 10). Já em cistos contendo espermátides, o lantânio rodeou o cisto, mas não alcançou o lúmen, sendo impedido de penetrar nos espaços entre células de Sertoli adjacentes. O traçador também foi excluído do lúmen dos túbulos seminíferos contendo espermatozóides. Regiões de forte aposição entre as membranas plasmáticas de células adjacentes foram observadas, visualizando-se junções oclusivas e desmossomos (Prancha 11). Estes resultados indicam que existe uma barreira de permeabilidade, formada por junções oclusivas entre células de Sertoli adjacentes, nos testículos de *Gymnotus aff. carapo*. Esta barreira é estabilizada nas etapas finais da meiose, de forma que somente células germinativas haplóides são separadas do compartimento vascular e do sistema imune. A barreira não inclui a participação de células endoteliais dos vasos sanguíneos como ocorre em algumas espécies de mamíferos. A fim de confirmar a presença de junções oclusivas na estrutura da barreira de permeabilidade do testículo foram realizadas algumas réplicas de criofratura que permitiram visualizar a presença das proteínas integrais constituintes das junções oclusivas. Vemos nas imagens da prancha 11 réplicas de criofratura nas quais as junções oclusivas aparecem como fileiras paralelas de partículas individuais ou como fitas selantes anastomosadas nas faces P e E da membrana plasmática.

PRANCHA 9



Prancha 9

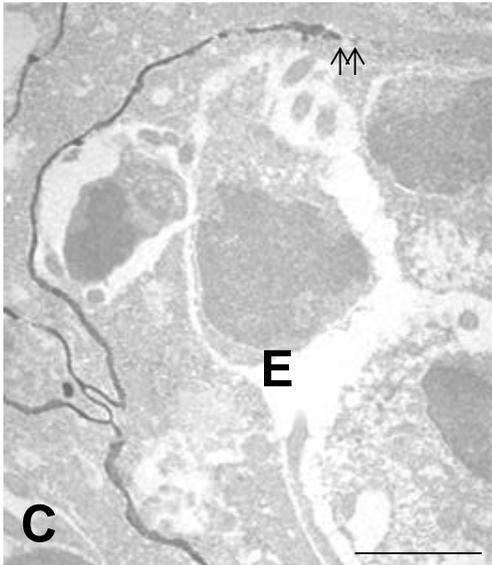
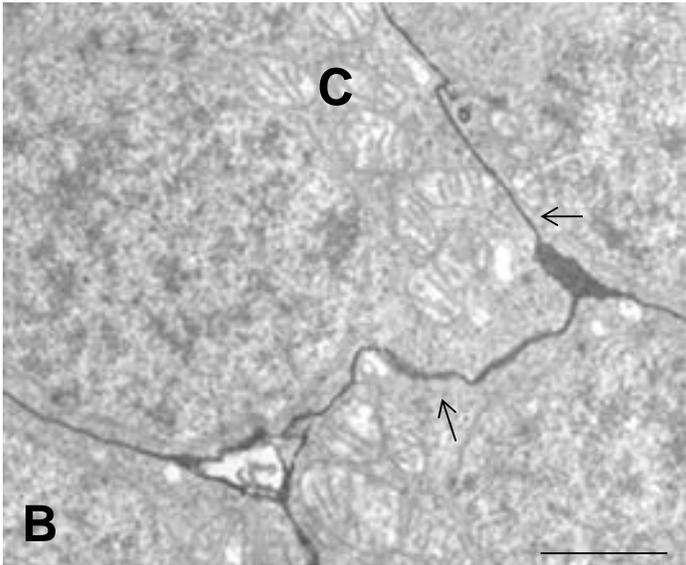
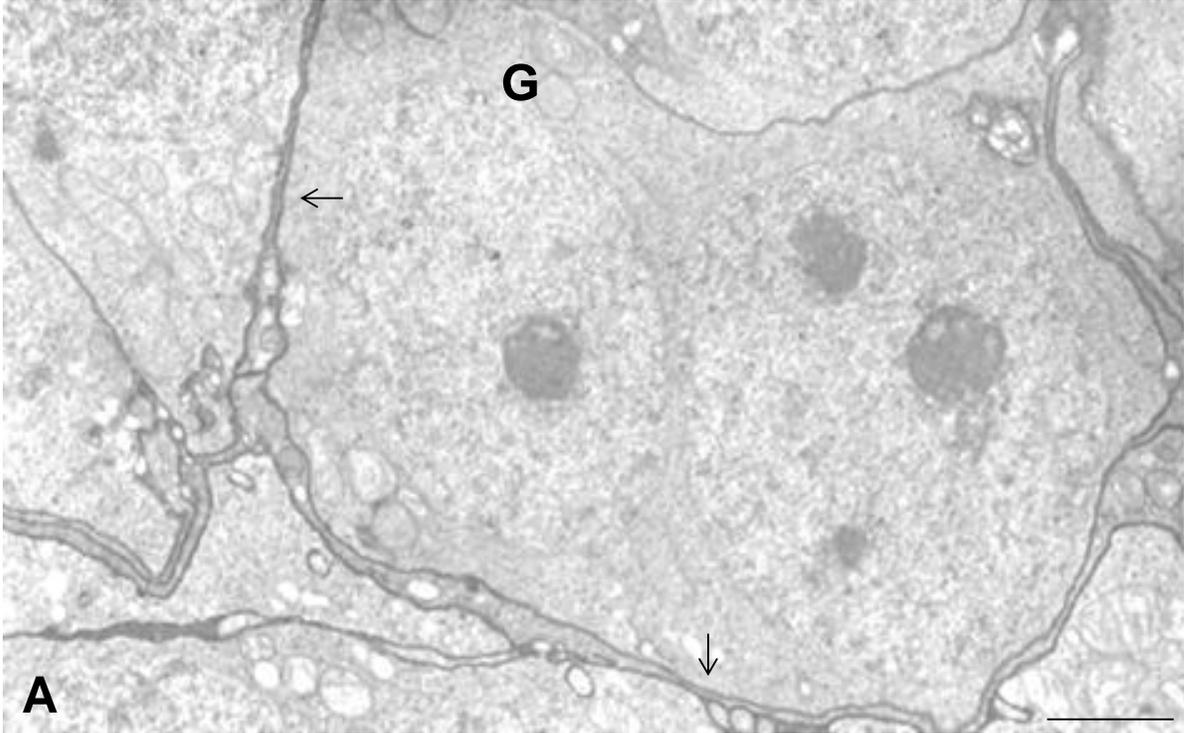
Figuras A – B – C. Detalhes ultraestruturais do epitélio que forma a região distal da via seminal de *Gymnotus aff. carapo*. Na figura A observa-se células colunares, com núcleo (N) localizado próximo a porção basal e mitocôndrias (m) concentradas na porção apical do epitélio. Microvilosidades (mv). Em maior aumento (figura B), a região apical do epitélio, mostrando desmossomo (d) e junção oclusiva (jo). Presença de muitos desmossomos (d) neste epitélio.

Barra_A = 2 μ m

Barra_B = 500nm

Barra_C = 1 μ m

PRANCHA 10



Prancha 10

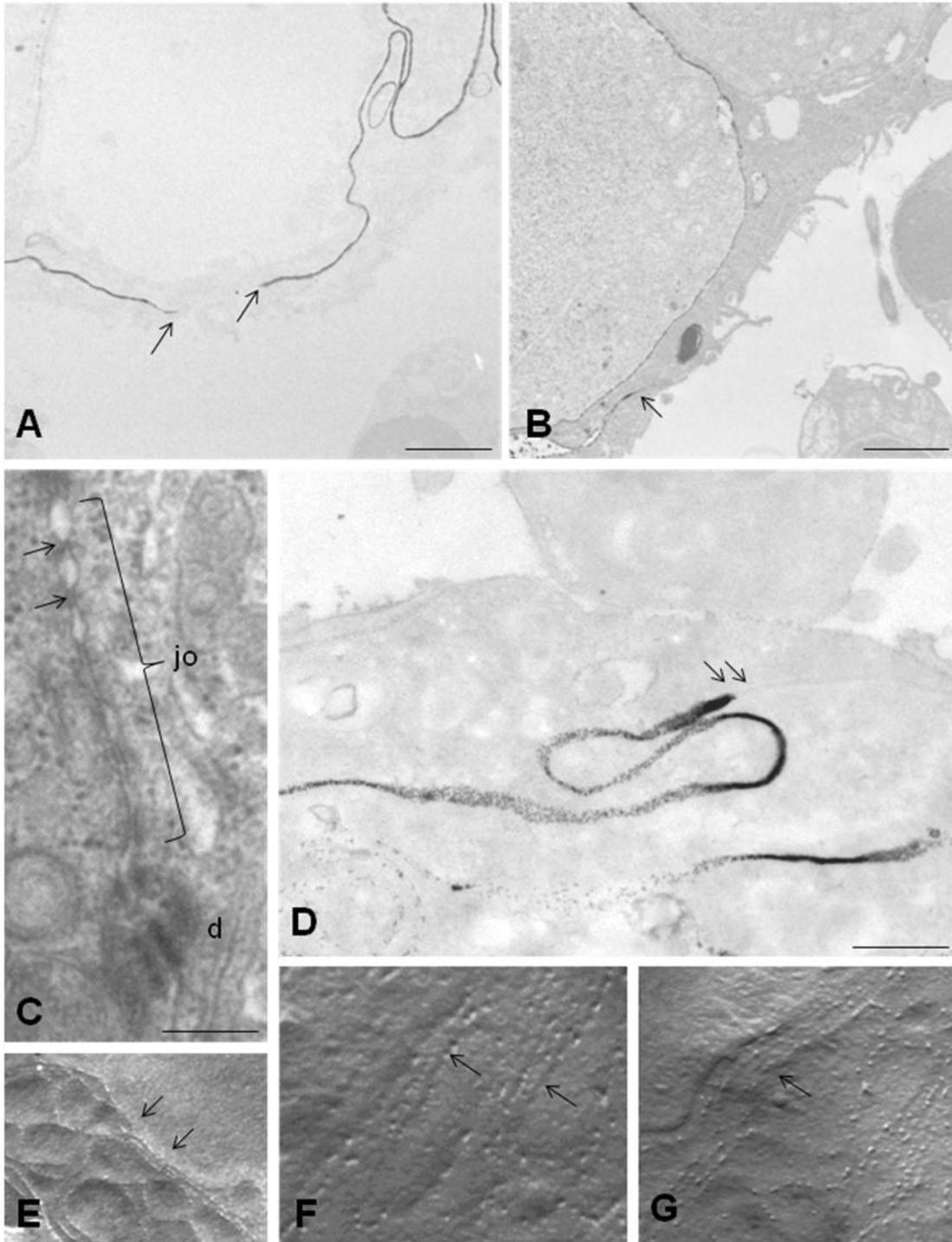
Figuras A – B. Cortes ultrafinos de testículos, tratados com nitrato de lantânio, onde observa-se que o traçador penetrou no compartimento intersticial da gônada, rodeou e apareceu no interior de cistos de espermatogônias (G) e espermatócitos em fase inicial do processo meiótico (C) (setas).

Barra_{A,B} = 1 μ m

Figura C. Micrografia eletrônica mostrando o lantânio sendo impedido de entrar no cisto contendo espermátides maduras (E) (setas).

Barra = 500nm

PRANCHA 11



Prancha 11

Figuras A – B – D. Cortes ultrafinos de testículos tratados com nitrato de lantânio. O traçador percorre os espaços intercelulares mas não consegue alcançar o lúmen dos cistos de espermátides e o lúmen dos túbulos seminíferos (setas).

Barra_{A,B} = 2 μ m

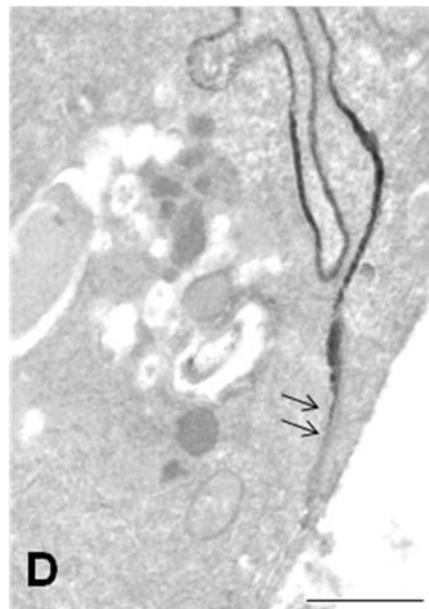
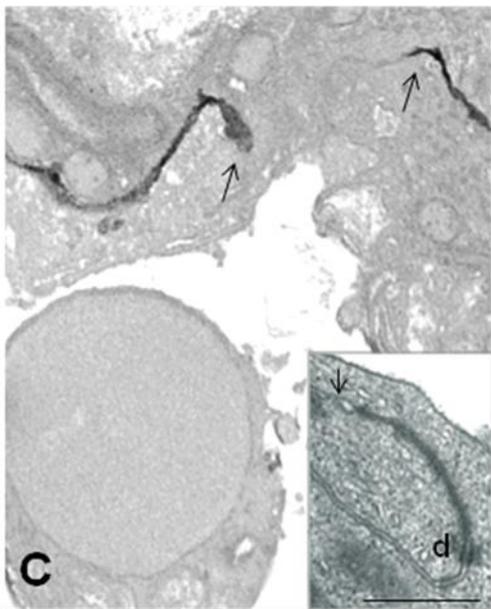
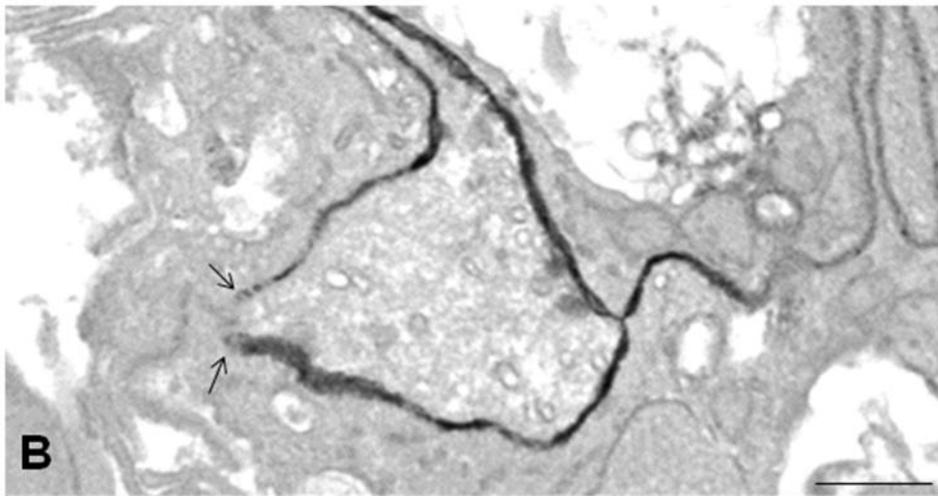
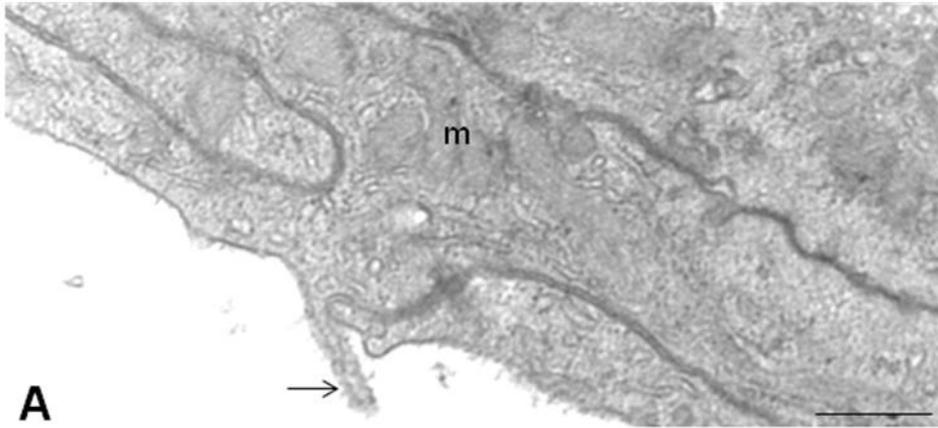
Barra_D = 1 μ m

Figura C. Região de contato entre duas células de Sertoli no testículo, onde visualiza-se uma série de pontos focais entre as membranas (junções oclusivas -jo) associados a desmossomos (d).

Barra = 500nm

Figuras E – F – G. Eletromicrografias de criofraturas mostrando as junções oclusivas como fileiras paralelas de partículas individuais (F e G) ou como fitas selantes anastomosadas (E) (setas).

PRANCHA 12



Prancha 12

Figura A. Eletromicrografia da região proximal da via seminal, onde observa-se um pequeno prolongamento das células epiteliais em direção ao lúmen do ducto (seta). No citoplasma destas células observam-se mitocôndrias (m), entre outras estruturas.

Barra = 500nm

Figuras B – C – D. Cortes ultrafinos da região inicial da via seminal, mostrando o marcador elétron-denso sendo impedido de alcançar o lúmen deste ducto (setas), próximo a região apical do epitélio. No “insert” observa-se uma região de íntimo contato entre duas membranas celulares adjacentes, onde visualizam-se junções do tipo desmossomo (d) e junção oclusiva (seta).

Barra_{B,C,D} = 500nm

Barra = 500nm (insert)

Na via seminal o traçador elétron-denso penetrou entre as células epiteliais, mas foi interrompido na região apical deste epitélio por junções do tipo oclusivas, que não permitiram que o marcador atingisse o lúmen. Estes resultados sugerem que a citada barreira de permeabilidade tem continuidade nas vias seminais e que a base estrutural desta barreira são as junções oclusivas (Prancha 12).

5.3 Avaliação eletroforética do conteúdo luminal dos testículos e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo*

Os perfis eletroforéticos de proteínas obtidas do fluido testicular e da via seminal de *Gymnotus aff. carapo* quando comparados com o perfil eletroforético de proteínas provenientes do sangue, demonstraram diferenças significativas entre eles (figura 8).

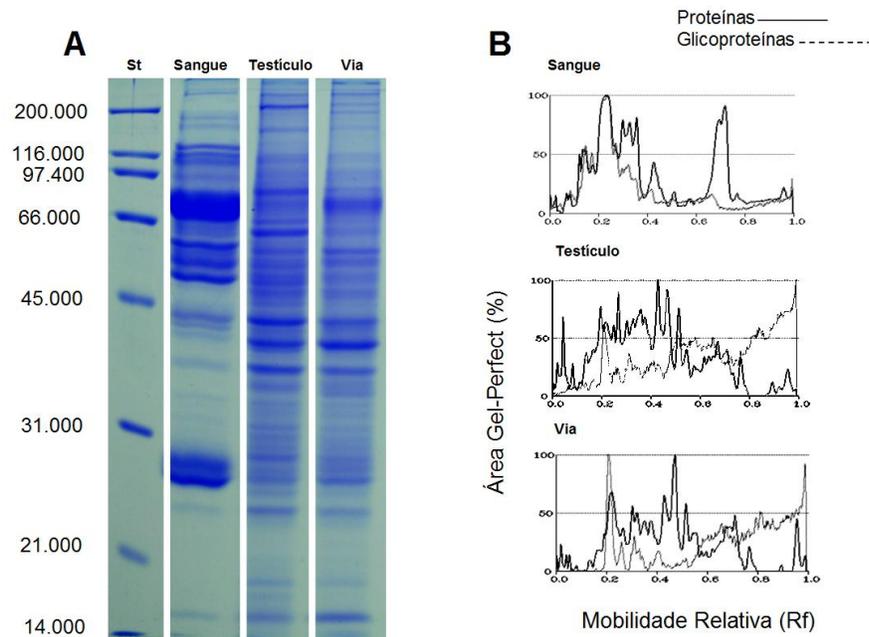


Figura 8. SDS-PAGE 12% das proteínas obtidas do plasma sanguíneo, do fluido testicular e da via seminal de *Gymnotus aff. carapo*. **A)** Imagem do gel de poliacrilamida 12% com 0,1% de SDS e 10% B-mercaptoetanol, corado com azul Brillhante de Coomassie R-250, mostrando os perfis eletroforéticos de 30µg de proteínas do plasma sanguíneo, 30µg de proteínas do fluido do testículo e 30µg de proteínas do fluido da via seminal. **B)** A mobilidade eletroforética relativa (Rf) das proteínas e a área ocupada por elas se observam nos densitogramas realizados com o programa “Gel Perfect”.

No plasma sanguíneo foram observadas bandas protéicas de massas moleculares: 194.360, 179.400, 183.700, 137.680, 94.080, 81.880, 73.310, 66.000,

62.100, 57.820, 53.560, 48.850, 45.380, 42.820, 40.730, 37.450, 34.070, 31.880, 29.130, 28.000, 26.620, 24.460 daltons, sendo que as proteínas de maior concentração apresentaram mobilidades relativas (Rf) de: 0.11, 0.22, 0.24, 0.26, 0.29, 0.32, 0.41, 0.65 e 0.66; e massas moleculares relativas de 160.000, 73.000, 66.000, 62.000, 57.000, 53.000, 43.000, 29.000 e 28.000 daltons, respectivamente. Entretanto, no fluido testicular foram observadas muitas bandas protéicas, entre elas as de 185.660, 172.350, 137.680, 95.520, 81.880, 72.380, 85.430, 61.580, 58.430, 52.630, 49.090, 45.280, 44.380, 42.250, 39.670, 36.880, 34.880, 32.840, 31.330, 30.510, 28.480, 26.770, 25.590, 24.180 daltons, sendo que as proteínas de maior concentração apresentaram mobilidades relativas (Rf) de: 0.2, 0.3, 0.47, 0.51, 0.70 e 0.76; e massas moleculares relativas de 82.000, 58.000, 40.000, 37.000, 27.000 e 15.000 daltons, respectivamente. Os perfis eletroforéticos das proteínas do fluido do testículo e da via seminal também apresentaram algumas diferenças entre si, sendo que algumas proteínas presentes no fluido testicular não foram observadas no fluido da via seminal, assim como há proteínas que estão presentes no fluido da via e que não foram visualizadas no fluido testicular. No fluido da via seminal foram observadas aproximadamente 25 bandas protéicas (193.250, 182.500, 97.000, 84.440, 74.850, 67.020, 62.100, 58.430, 53.550, 49.950, 46.190, 44.070, 42.030, 39.470, 36.670, 35.350, 34.450, 32.330, 31.180, 29.970, 28.320, 27.530, 26.620, 24.050, 15.150 daltons), sendo que as proteínas de maior concentração apresentam mobilidades relativas (Rf) de: 0.05, 0.2, 0.21, 0.26, 0.43, 0.5, 0.7, 0.77 e 0.95; e massas moleculares relativas de 182.000, 84.000, 74.000, 62.000, 42.000, 36.000, 26.000, 24.000 e 15.000 daltons, respectivamente.

A técnica de PAS permitiu verificar que algumas destas proteínas presentes no trato reprodutivo e no sangue correspondem a glicoproteínas. O perfil glicoprotéico do plasma sanguíneo também difere daqueles do fluido do testículo e da via seminal (figura 9).

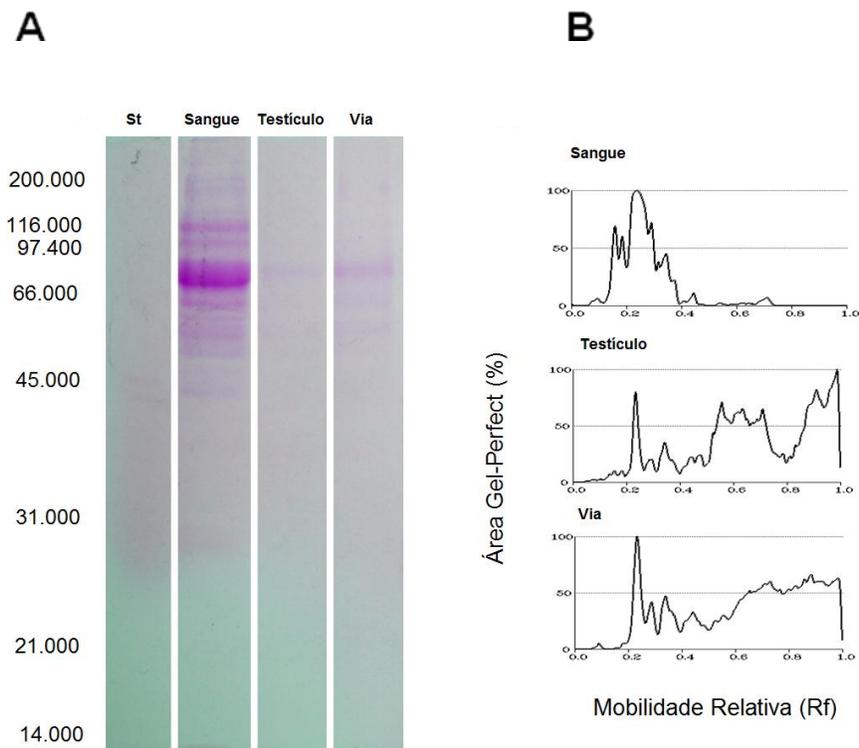


Figura 9. SDS-PAGE 8% das glicoproteínas obtidas do plasma sanguíneo, do fluido testicular e da via seminal de *Gymnotus aff. carapo*. A) Imagem do gel de poliacrilamida 8% com 0,1% de SDS e 10% B-mercaptoetanol, corado com a técnica de PAS, mostrando os perfis glicoprotéicos de 30 μ g de proteínas do plasma sanguíneo, 30 μ g de proteínas do fluido do testículo e 30 μ g de proteínas do fluido da via seminal. B) A mobilidade eletroforética relativa (Rf) das glicoproteínas e a área ocupada por elas são observadas nos densitogramas realizados com o programa "Gel Perfect".

No plasma sanguíneo, as proteínas de massas moleculares equivalentes a 174.340, 163.700, 130.87, 84.060, 80.830, 72.380, 67.070, 62.640, 58.430, 54.500, 50.390, 46.580, 43.600, 38.040, 35.530, 33.540, 30.480 e 29.130 daltons correspondem a glicoproteínas. As proteínas majoritárias apresentaram uma mobilidade relativa (Rf) de 0.19, 0.21, 0.24 e 0.28; e massas moleculares relativas de 121.000, 83.000, 75.000 e 66.000 daltons, respectivamente. No fluido testicular as proteínas de massas moleculares de 76.999, 54.970, 50.380, 43.600, 41.580, 39.050, 37.060, 35.720, 34.610, 33.020, 31.330, 29.480, 28.160, 26.020, 25.020, 24.050, 23.250, 22.350, 21.240, 20.180, 18.840, 17.250, 15.810, 14.860, 14.000 daltons correspondem a glicoproteínas; sendo a proteína majoritária aquela de mobilidade relativa (Rf) de 0.21 e massa molecular de 77.000 daltons. O fluido da via seminal apresentou algumas

bandas marcadas com PAS, que vão desde 77.000 até 15.000 daltons (76.999, 63.190, 55.450, 52.180, 43.830, 33.720, 32.160, 31.160, 29.800, 28.480, 26.770, 25.440, 24.320, 23.250, 22.350, 21.380, 20.580, 19.400, 18.470, 17.230, 16.240, 15.300 daltons), sendo que a proteína com maior concentração apresentou mobilidade relativa (Rf) de 0.21 e massa molecular de 77.000 daltons.

Esses resultados sugerem e apoiam a hipótese da presença de uma barreira de permeabilidade no trato reprodutor da espécie em estudo.

5.4 Imunomarcção das proteínas ocludina e claudina presentes nas junções oclusivas

A detecção da proteína ocludina no fluido do testículo e da via seminal foi realizada através da técnica de *Western blotting*. Dois géis SDS-PAGE eram realizados em paralelo, sendo que um era corado com azul Brillhante de Coomassie para a visualização do perfil eletroforético das proteínas presentes em cada amostra, e o outro era transferido para uma membrana de nitrocelulose. Na imagem da membrana imunomarcada (visualizada com luz ultravioleta), a seta mostra a banda protéica diferente que não aparece somente no canal onde foi colocado o anticorpo anti-occludina puro conjugado a FITC. A análise densitométrica mostra que esta proteína apresenta uma mobilidade relativa de 0.42 e uma massa molecular de 50.000 daltons, podendo representar a proteína de interesse, ocludina (figura 10).

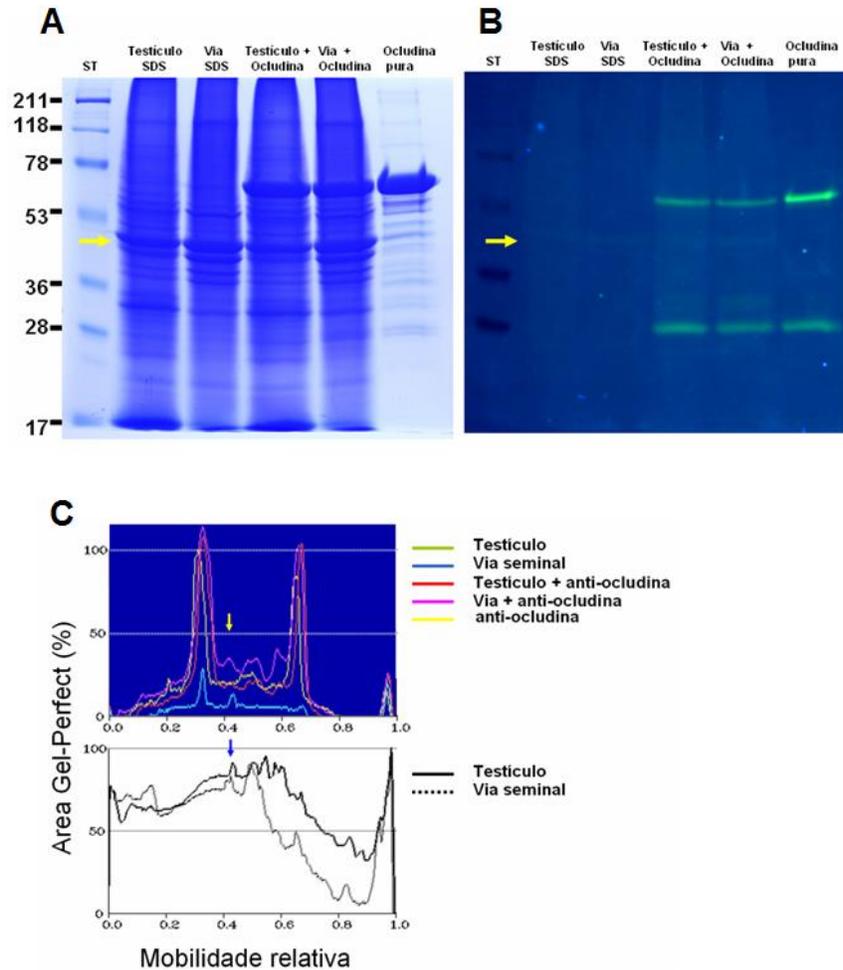


Figura 10. Detecção de ocludina em proteínas obtidas do fluido do testículo e da via seminal de *Gymnotus aff. carapo*. **A)** Imagem do gel de poliacrilamida 12% com 0,1% de SDS e 10% B-mercaptoetanol, corado com azul Brillhante de Coomassie R-250, mostrando os perfis eletroforéticos de 60µg de proteínas do fluido do testículo, 60µg de proteínas do fluido da via seminal, 60µg de proteínas do fluido do testículo misturadas com 1µg de anticorpo anti-occludina conjugado a FITC, 60µg de proteínas do fluido da via seminal misturadas com 1µg de anticorpo anti-occludina conjugado a FITC e 1µg do anticorpo anti-occludina. **B)** Imagem da membrana de nitrocelulose (visualizada com luz ultravioleta), à qual foi transferido o perfil protéico obtido no gel. A seta mostra a banda protéica diferente que não aparece no canal onde foi colocado o anticorpo anti-occludina puro. Esta banda apresenta uma mobilidade relativa (Rf) de 0.42 e uma massa molecular de 50.000, podendo representar a proteína de interesse, ocludina. **C)** A mobilidade eletroforética relativa (Rf) das proteínas e a área ocupada por elas se observam nos densitogramas realizados com o programa “Gel Perfect”. Densitograma do gel SDS-PAGE (preto e branco) e da membrana de nitrocelulose (colorido).

A detecção da proteína claudina no fluido do testículo e da via seminal se realizou de forma similar à descrita para a ocludina. Na imagem da membrana de nitrocelulose imunomarcada são observadas bandas protéicas que podem corresponder a fragmentos da proteína de interesse, claudina (figura 11). Estas bandas

apresentam uma mobilidade relativa (Rf) de 0.85 e 0.9 e massas moleculares de 13.500 e 8.500 daltons, respectivamente.

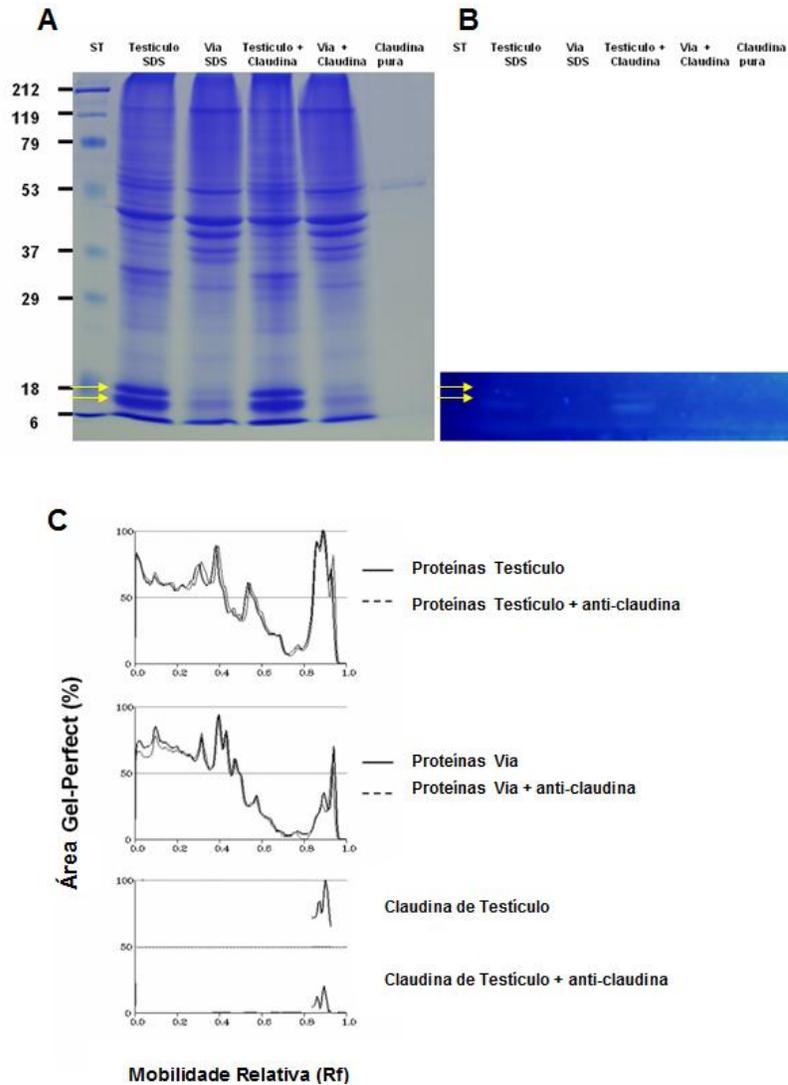


Figura 11. Detecção de claudina em proteínas obtidas do fluido do testículo e da via seminal de *Gymnotus aff. carapo*. **A)** Imagem do gel de poliacrilamida 12% com 0,1% de SDS e 10% B-mercaptoetanol, corado com azul Brillhante de Coomassie R-250, mostrando os perfis eletroforéticos de 60µg de proteínas do fluido do testículo, 60µg de proteínas do fluido da via seminal, 60µg de proteínas do fluido do testículo misturadas com 1µg do anticorpo anti-claudina, 60µg de proteínas do fluido da via seminal misturadas com 1µg do anticorpo anti-claudina e somente 1µg do anticorpo anti-claudina. **B)** Imagem da membrana de nitrocelulose (visualizada com luz ultravioleta), à qual foi transferido o perfil proteico obtido no gel. A seta está mostrando as duas bandas diferentes que não aparecem no canal em que foi colocado o anticorpo anti-claudina puro. Elas apresentam uma mobilidade relativa de 0.85 e 0.9 e massas moleculares de 13.500 e 8.500 respectivamente. **C)** A mobilidade eletroforética relativa (Rf) das proteínas e a área ocupada por elas se observam nos densitogramas realizados com o programa “Gel Perfect”.

6. DISCUSSÃO.

Existe, em geral, uma grande variação na organização do testículo e dos padrões espermatogênicos dos mamíferos comparados com os peixes, provavelmente por uma maior variedade reprodutiva apresentada por este último grupo, que vai desde espécies que liberam os gametas no ambiente aquoso a estratégias altamente especializadas envolvendo fertilização interna. Estas diferenças são refletidas no processo espermatogênico, particularmente na espermiogênese, quando se define a morfologia espécie - específica do espermatozóide, ou na ocorrência ou não de ondas espermatogênicas (PUDNEY, 1993). Apesar da grande diversidade reprodutiva deste grupo de vertebrados, a espermatogênese é um processo conservado entre as diferentes espécies de peixes (NÓBREGA et al., 2009).

Nossos resultados indicam que na espécie em estudo, *Gymnotus aff. carapo*, os testículos apresentam um formato ovalado e estão localizados próximos à extremidade caudal do conjunto visceral, ao contrário dos testículos alongados que se estendem por quase todo o comprimento da cavidade abdominal observado na maioria dos peixes teleósteos (BARBIERI E BARBIERI, 1984a). Eles apresentam estrutura do tipo tubular anastomosada, segundo a classificação proposta por GRIER et al. (1980) isto é, o compartimento germinativo é formado por túbulos ramificados que se interconectam da periferia até o ducto testicular principal, o que contrasta com a estrutura observada em peixes mais desenvolvidos (Neoteleostei), onde o testículo é do tipo lobular com ductos seminíferos em formato digitiforme na periferia ventro-lateral do testículo. Segundo PARENTI E GRIER (2004), em Teleostei, o padrão tubular anastomosado é observado em espécies pertencentes aos grupos mais basais na escala evolutiva.

Como descrito em diferentes espécies de peixes teleósteos, em *Gymnotus aff. carapo* foi observado que a espermatogênese ocorre no interior dos cistos, que são formados quando uma espermatogônia primária ou tipo A é completamente envolvida pelas células de Sertoli. Devido à citocinese incompleta, as células resultantes das divisões mitóticas de uma única espermatogônia permanecem interconectadas pelas pontes citoplasmáticas; estas pontes são responsáveis pelo desenvolvimento sincrônico das células germinais. Por esta razão, acredita-se que no arranjo cístico da espermatogênese, as células de Sertoli estão geralmente em contato com um único

clone de células germinativas (NÓBREGA et al., 2009). Segundo LOIR et al. (1995) e PUDNEY (1995), esta é a principal diferença da espermatogênese não cística (encontrada em répteis, aves e mamíferos), em que as células de Sertoli estão em contato com muitos clones de células germinais ao mesmo tempo.

Na espécie em estudo foi observado que o rompimento do cisto, e consequente liberação das células germinativas para o lúmen testicular, ocorre na fase de espermatíde. Segundo GRIER (1993), este processo espermatogênico é do tipo semi-cístico, quando no momento do rompimento do cisto as células germinativas encontram-se na fase de espermatíde. Resultados similares foram observados no gênero *Ophidion* (MATTEI et al., 1993) e posteriormente em *Bryconops affinis* (ANDRADE et al., 2001), *Scorpaena notata* (MUÑOZ et al., 2002), *Galeocharax knerii* (MAGALHÃES et al., 2004). Já a espermatogênese do tipo cística ocorre quando no momento do rompimento do cisto as células encontram-se na fase de espermatozóide, situação observada em outras espécies, como em *Leporinus silvestrii* (ANDRADE e GODINHO, 1983), *Gambusia affinis holbrooki* (FRAILE et al., 1992; ANDRADE et al., 2001). Segundo SCHULZ et al. (2010) ainda não está claro se ocorre perda de células de Sertoli em associação com o processo de espermição em peixes.

As células de Sertoli observadas nos testículos de *Gymnotus aff. carapo* são similares àquelas descritas em outras espécies de teleósteos (GRIER, 1993). Seus prolongamentos laterais envolvem e dão suporte estrutural as células germinativas, formando os cistos. Além disso, participam da formação de uma barreira de permeabilidade, que cria um microambiente que possibilita o controle da diferenciação das células germinativas, do processo de desprendimento das espermatídes em direção à luz do túbulo, fagocitam restos citoplasmáticos liberados durante o processo de espermiogênese, entre outras funções próprias deste tipo celular (PUDNEY, 1995). Durante o desenvolvimento deste trabalho foi possível observar, nos cortes ultrafinos de testículo de *Gymnotus aff. carapo*, vacúolos digestivos contendo células germinativas fagocitadas no citoplasma das células de Sertoli. Segundo SCHULZ et al. (2010) a célula de Sertoli fagocita células germinativas apoptóticas, corpos residuais descartados pelas espermatídes durante a espermição, e espermatozoides residuais.

Em peixes teleósteos, a proliferação de células de Sertoli ocorre durante a proliferação espermatogonial, permitindo que estas células formem o espaço requerido pelo clone de células germinativas em crescimento. Assim, coincidindo com o aumento do volume do cisto e do número de células germinais por cisto, o número de células somáticas aumenta significativamente em cistos de espermatogônias primárias, comparado aos cistos de espermatócitos. A proliferação destas células diminui quando as células germinais entram em meiose, e se detêm nos cistos pós-meióticos (SCHULZ et al., 2010).

Os espermatozoides de peixes mostram mais diversidade morfológica do que aqueles de outros vertebrados, e sua ultraestrutura fornecem parâmetros para análise filogenética (JAMIESON E LEUNG, 1991; MATTEI, 1991). Existem duas formas de classificar os espermatozoides de peixes, aquasperma (pertencentes a peixes de fertilização externa) e introsperma (pertencentes a peixes de fertilização interna). A estrutura básica do espermatozoide de espécies que são de fertilização externa tende a ser um aquasperma anacrossomal, apresentando um núcleo esférico ou ovóide e uma peça intermediária curta (JAMIESON, 1991). O espermatozoide de *Gymnotus aff. carapo* mostrou uma estrutura típica de teleósteos de fertilização externa, pois apresentam um núcleo esférico, uma peça intermediária pequena e não possuem acrossoma. Os espermatozoides de peixes teleósteos geralmente não apresentam acrossoma e é a micrópila que dá acesso, ao espermatozoide, à membrana plasmática do gameta feminino (JAMIESON, 1991). Contudo, vacúolos (considerados por alguns autores vestígios de acrossomas) podem ser encontrados em alguns teleósteos (BILLARD, 1983). MATTEI (1970) descreve dois tipos básicos de espermatozoides de teleósteos baseados no processo de rotação nuclear durante a espermiogênese. No tipo I o núcleo roda 90° em relação ao eixo flagelar, resultando em um flagelo localizado perpendicularmente ao eixo nuclear. No tipo II, a rotação nuclear não ocorre, o que resulta em um flagelo localizado lateralmente em relação ao núcleo. Outro tipo de espermiogênese, tipo III, descrito por QUAGIO-GRASSIOTTO E OLIVEIRA (2008), ocorre quando o flagelo se desenvolve em uma posição central em relação ao núcleo; o núcleo não roda durante a espermiogênese e a formação de uma fossa nuclear e canal citoplasmático não ocorre. Em *Gymnotus aff. carapo* os espermatozoides são

morfologicamente similares ao descrito no tipo II, apresentando um flagelo paraxial localizado lateralmente em relação ao núcleo.

Em mamíferos, numerosos estudos têm sido focalizados nas interações funcionais entre os diferentes tipos de células presentes no testículo; entretanto, em peixes, poucos trabalhos se referem a este tema. Contudo, sabe-se que as junções de adesão entre células de Sertoli e células germinais, entre células germinais ou entre células de Sertoli contribuem na manutenção da estrutura tridimensional e na organização das células germinativas no interior dos cistos. Além disto, em algumas espécies de peixes teleósteos, tem sido demonstrada a presença de junções oclusivas entre as células de Sertoli, correlacionando-as com a ocorrência de uma barreira de permeabilidade. Uniões de comunicação (nexos) e moléculas de conexina, que podem estar relacionadas com o desenvolvimento sincrônico das células germinativas no cisto, também têm sido observadas em peixes (BATLOUNI et al., 2009, NÓBREGA et al., 2009).

No presente trabalho verificou-se a presença de diferentes tipos de junções celulares, tanto entre as células somáticas testiculares, como entre as células epiteliais da via seminal, entre elas, junções oclusivas e desmossomos. A utilização do lantânio como traçador de permeabilidade permitiu demonstrar que o traçador entrou no compartimento intersticial da gônada, penetrou entre as células que formam a parede dos cistos e alcançou o lúmen dos cistos de espermatogônias e espermatócitos em fases iniciais da meiose; contudo, não foram observados em cistos contendo espermatídes e no lúmen dos túbulos seminíferos. Este método permitiu visualizar o local e momento nos quais a barreira começa a ser efetiva na exclusão do traçador, e demonstra, portanto, a existência de uma barreira hematotesticular nos testículos de *Gymnotus aff. carapo*. A presença de junções oclusivas foi corroborada utilizando a técnica de criofatura. Este tipo de junção constitui a base estrutural das barreiras de permeabilidade presentes em vertebrados, e permite a criação de um microambiente adequado para o desenvolvimento normal das células germinativas.

Em *Gymnotus aff. carapo*, a barreira hematotesticular parece ser estabelecida ao final da meiose, permitindo que células germinativas haplóides estejam protegidas do compartimento vascular e do sistema imunológico. A ocorrência de uma barreira de

permeabilidade foi relatada anteriormente nos trabalhos de ABRAHAM et al. (1980), MARCAILLOU E SZRLLRSI (1980), BERGMANN et al. (1984), SHIBATA E HAMAGUCHI (1986) e SILVA E GODINHO (1989), em *Aphanius díspar*, *Poecilia reticulata*, *Ameca splendens*, *Oryzias latipes* e na tilápia nilótica, respectivamente.

Em mamíferos, a barreira hematotesticular é estabilizada imediatamente depois do início da meiose (DYM E FAWCETT, 1970; RUSSELL, 1977; DYM E CAVICCIA, 1978), surgindo concomitantemente ao aparecimento de espermátócitos em fase de paquíteno, quando é observada a presença de junções de oclusão entre as células de Sertoli adjacentes (DE OLIVEIRA GOMES et al., 2006). Este fato indica sua relação com o processo meiótico e formação de espermatozóides haplóides. Assim, a formação das junções oclusivas entre células de Sertoli marca o fim do período de proliferação e diferenciação desta célula, de modo que agora as células de Sertoli podem suportar células germinais meióticas e pós-meióticas no compartimento adluminal do epitélio seminífero, segregado por junções oclusivas do compartimento basal contendo espermatogônias. Um desenvolvimento similar, ao de mamíferos, pode ser observado no testículo dos peixes teleósteos, embora adaptado para três condições específicas da espermatogênese cística. Primeiro, o máximo volume do cisto é atingido quando as células germinativas progrediram a espermatócito no estágio paquíteno durante a meiose, e a proliferação da célula de Sertoli continua - embora de forma menos intensa do que durante a fase espermatogonial - até o início de espermiogênese. Em segundo lugar, cada cisto funciona como uma estrutura independente que segue o seu próprio tempo de desenvolvimento. Isto está em contraste com a onda geral de diferenciação da célula de Sertoli em um período de tempo relativamente curto no epitélio germinativo de vertebrados amnióticos. Em terceiro lugar, a barreira de células de Sertoli em peixes parece ser estabelecida no final ou após a meiose e somente células germinativas haplóides são protegidas do compartimento vascular e do sistema imunitário (SCHULZ et al., 2010). Importante mencionar que as características peculiares das junções oclusivas presentes nos testículos de vertebrados não mamíferos e mamíferos sugerem que estas estruturas são altamente conservadas durante a evolução (SPRANDO E RUSSELL, 1987). Além disso, postula-se que somente nos testículos que apresentam organização cística (teleósteos e anfíbios anuros) as junções oclusivas estão

regularmente associadas à desmossomos (BERGMANN et al., 1984), aspecto este que foi observado neste trabalho.

No presente estudo também foi analisada a morfologia do ducto espermático de *Gymnotus* aff. *carapo*, focando na detecção de uma barreira de permeabilidade neste órgão. São relativamente escassos os trabalhos relacionados à ultraestrutura dos ductos espermáticos nas diferentes espécies de teleósteos de água doce, podendo ser citados os de LAHNSTEINER et al. (1993a) em peixes salmonídeos; LAHNSTEINER et al. (1993b) em *Esox lucius*; LAHNSTEINER et al. (1994) em peixes ciprinídeos; MANNI E RASOTTO (1997) em *Opistognathus whitehurstii* e LO NOSTRO et al. (2003) em *Synbranchus marmoratus*. Nossos resultados mostraram que, em *Gymnotus* aff. *carapo*, a porção inicial do ducto espermático é formada por uma camada de células epiteliais baixas, as quais são relacionadas com as células de Sertoli testiculares por alguns autores. Em Atheriniformes, foi proposto que células de Sertoli diferenciadas formariam as células do ducto (GRIER, 1993). Este mesmo autor mostra que em poecilídeos as células de Sertoli hipertrofiam e se transformam em células colunares para formar o ducto espermático. Foi observada uma alta incidência de atividade fagocítica na região proximal do ducto. A presença de vacúolos digestivos no citoplasma das células do ducto espermático sugere que elas estão envolvidas na reabsorção de espermatozóides em degeneração. Atividade fagocítica também foi observada no ducto espermático de *Opistognathus whitehurstii* (MANNI E RASOTTO, 1997). Já a porção distal do ducto espermático de *Gymnotus* aff. *carapo* é formado por um epitélio de células colunares, conectadas por diferentes tipos de junções celulares (junções oclusivas e desmossomos) e não parece apresentar atividade fagocítica. Em relação à morfologia das células que formam esta região do ducto, houve semelhança entre os resultados obtidos neste trabalho com os descritos para *Salaria pavo* (LAHNSTEINER E PATZNER, 1990); *Opistognathus whitehurstii* (MANNI E RASOTTO, 1997); *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO et al., 2003); e para diferentes espécies de teleósteos marinhos (LAHNSTEINER, 2003).

Trabalhos relacionados à detecção de uma barreira de permeabilidade, utilizando marcadores elétron-densos de permeabilidade, nos ductos espermáticos são mais escassos. Em *Gymnotus* aff. *carapo*, foi observado que as células epiteliais do ducto

estão fortemente unidas por junções do tipo desmossomos e junções oclusivas, localizadas preferencialmente na região apical do epitélio, próximo ao lúmen do ducto, demonstrando que a barreira de permeabilidade presente no testículo continua nas vias seminais, cumprindo um papel protetor dos gametas desta espécie. A presença de junções do tipo desmossomo e junção oclusiva entre as células epiteliais do ducto também foi descrita em *Synbranchus marmoratus* (LO NOSTRO et al., 2003). Nossos resultados, utilizando a técnica de exclusão do lantânio, mostraram que o marcador foi detido, por junções oclusivas, próximo a região apical do epitélio, não conseguindo alcançar o lúmen do ducto.

Nas vias seminais de mamíferos, os trabalhos de HOFFER E HINTON (1984) e LÓPEZ et al. (1997), realizados em roedores e equinos, respectivamente, mostraram que as diferenças existentes na composição do plasma sanguíneo e do fluido epididimário seriam mantidas pelas junções oclusivas presentes entre as células principais do epitélio epididimário, as quais formam uma barreira de permeabilidade chamada de hemato-epididimária. Os estudos ultraestruturais realizados por estes autores demonstraram que as junções oclusivas formam uma rede contínua em torno de células epiteliais que revestem o ducto, e assim criam uma barreira ao transporte paracelular de água, solutos e outras moléculas. Esta barreira é dinâmica e heterogênea quanto à permeabilidade ao longo da via espermática, e sua desagregação leva a uma série de patologias (LÓPEZ et al., 1997).

A existência anatômica e funcional de uma barreira de permeabilidade nas gônadas e via seminal de *Gymnotus aff. carapo* foi também comprovada mediante o estudo do perfil eletroforético das proteínas presentes no plasma sanguíneo e no fluido seminal dos testículos e ductos desta espécie. Nossos resultados mostraram diferenças significativas entre as proteínas que compõem o plasma sanguíneo e as proteínas presentes no fluido seminal. Tal barreira contribuiria para a formação de um meio que contém concentrações ótimas de componentes específicos, que são favoráveis para manter a viabilidade do gameta.

Estudos prévios (STEYN E VAN VUREN, 1986; VLOK E VAN VUREN, 1988; VILJOEN E VAN VUREN, 1992) mostraram diferenças significativas entre a composição química (proteínas, lipídeos, glicose, íons) do plasma seminal e do plasma

sanguíneo de *Clarias gariepinus*, *Barbus aeneus*, *Labeo ruddi* e *Labeo rosae*, respectivamente, e sugeriram a presença de barreiras de permeabilidade que regulariam o trânsito destes componentes entre o sistema circulatório e o aparelho reprodutor. Em relação à concentração de proteínas, em *Gymnotus aff. carapo*, foi observada uma quantidade relativamente alta destas macromoléculas no fluido seminal; resultados contraditórios têm sido publicados em relação à concentração de proteínas no fluido seminal de teleósteos (LAHNSTEINER et al., 1995; CIERESZKO et al., 1998; KOWALSKI et al., 2003; LAHNSTEINER et al., 2004).

Ainda não está claro o papel das proteínas no fluido seminal de peixes, mas postula-se que estas macromoléculas possam atuar na proteção dos espermatozoides (KRÓL et al., 2011). Tem sido postulado que elas prolongariam a viabilidade dos gametas (LAHNSTEINER et al., 2004; LAHNSTEINER, 2007) e manteriam, em condições adequadas, a pressão osmótica, composição iônica e pH do plasma seminal (LI et al., 2009). Contudo, não foram encontrados dados na literatura relacionados à interação de proteínas com o espermatozoide durante o seu trânsito pelas vias seminais. Assim, informações a respeito da participação de proteínas na diferenciação do gameta seriam importantes para uma melhor compreensão dos processos de maturação espermática e fertilização neste grupo de vertebrados, além de fornecer subsídio para estudos posteriores em outras espécies de teleósteos.

7. CONCLUSÕES

A organização gonadal dos machos da espécie *Gymnotus aff. carapo* é do tipo tubular seminífera cística. No compartimento tubular ocorre o processo de espermatogênese, que compreende as clássicas etapas de multiplicação gonial, maturação meiótica e espermiogênese. A liberação das células germinais para o lúmen do túbulo ocorre na etapa de espermatíde (espermatogênese semicística), o que sugere que o processo espermatogênico se completaria no lúmen do túbulo seminífero.

A existência de uma barreira de permeabilidade nos testículos e vias seminais da espécie em estudo foi estabelecida mediante a análise de amostras tratadas com nitrato de lantânio e analisadas no microscópio eletrônico de transmissão. A presença de junções oclusivas entre células de Sertoli adjacentes, no testículo, e entre as células

epiteliais da via seminal fornece a base estrutural de uma barreira que separa as células germinativas jovens (diplóides) das maduras (haplóides), nos testículos, e que protege os espermatozóides durante o trânsito/armazenamento nas vias seminais. Através desta metodologia verificou-se que o lantânio penetra no compartimento intersticial da gônada, rodeia e invade os cistos de espermatogônias e de espermatócitos em fase inicial da meiose, porém é excluído de cistos de espermátides e do lúmen dos túbulos espermatogênicos. Isto é, a barreira começa a ser efetiva na exclusão do traçador no final da meiose, de modo que somente células haplóides estão protegidas do compartimento vascular e do sistema imune. Na via seminal, a passagem do lantânio é interrompida na região apical do epitélio, por junções do tipo oclusivas, não alcançando o lúmen do ducto.

A técnica de criofatura permitiu verificar a presença de junções oclusivas nos testículos, as quais aparecem como fileiras paralelas de partículas individuais ou como uma banda formada por fitas selantes anastomosadas.

Outra evidência da presença da barreira de permeabilidade nas gônadas e vias seminais de *Gymnotus aff. carapo* é a diferença existente no perfil eletroforético das proteínas do fluido seminal comparado com aquele do plasma linfático, bem como a marcação das proteínas ocludina e claudina pela técnica de *Western Blotting*.

8. BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM, M.; RAHAMIM, E.; TIBIKA, H.; GOLENSER, E. - The Blood-Testis Barrier in *Aphanius dispar* (Teleostei). Cell Tissue Research. 211(2): 207-214 (1980).

ALBERT, J.S.; CRAMPTON, W.G.R. - Seven new species of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes) with a redescription of *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758). Zootaxa. 28: 1-54 (2003).

ALBERT, J.S.; CRAMPTON, W.G.R.; THORSEN, D.H.; LOVEJOY, N.R. - Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Gymnotidae: Teleostei). Syst. Biodivers. 2: 375-417 (2004).

ALBERT, J.S.; CRAMPTON, W.G.R. - Diversity and phylogeny of neotropical electric fishes (Gymnotiformes) p.360-409. In: BULLOCK, T.E.; HOPKINS, C.D.; POPPER, A.N.; FAY, F.R. (Eds.). Electroreception. Ithaca, Cornell University Press. p.472 (2005).

ANDO-AKATSUKA, Y.; SAITON, M.; HIRASE, T.; KISHI, M.; SAKAKIBARA, A.; ITOH, M.; YONEMURA, S.; FURUSE, M.; TSUKITA, S. - Interspecies diversity of the occluding sequence; cDNA cloning of human, mouse, dog and rat-kangaroo homologues. J. Cell Biology. 133: 43-47 (1996).

ANDRADE, D.R.; GODINHO, H.P. - Annual male reproductive cycle of the Brazilian teleost fish *Leporinus silvestrii* (Boulenger, 1902). Arch. Biol. 94: 1-14 (1983).

ANDRADE, R.F.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E., SATO, Y. - Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces:Characidae). Tissue & Cell. 33(5): 524-532 (2001).

BARBIERI, G.; BARBIERI, C.B. - Tipo de desova e fecundidade de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) da represa do Lobo, Estado de São Paulo. (Pisces, Cypriniformes).

Em Anais: Reunião anual da SBPC, Salvador: Universidade Federal da Bahia. 33: p.506 (1981).

BARBIERI, G.; BARBIERI, C.B. - Fecundidade e tipo de desova de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na represa do Lobo, Estado de São Paulo (Pisces, Gymnotidae). Spectrum (J. Bras. Ci) 2: 25-29 (1982a).

BARBIERI, G.; BARBIERI, C.B. - Crescimento e tamanho de primeira maturação sexual de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758), na represa do Lobo, Estado de São Paulo (Pisces, Ostariophysi, Gymnotidae). Em: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 34(7): p.557 (1982b).

BARBIERI, G.; BARBIERI, C.B. - Growth and first sexual maturation size of *Gymnous carapo* (Linnaeus, 1758) in the Lobo reservoir (state of São Paulo, Brazil) (Pisces, Gymnotidae). Rev.Hidrobiol Trop. 16: 195-201 (1983a).

BARBIERI, G.; BARBIERI, C.B. - Dynamics of reproduction of *Gymnotus carapo* in Lobo Reservoir, São Paulo State: Influence of abiotic factors (Pisces, Gymnotidae). Tropical Ecology. 24(24): 244-259 (1983b).

BARBIERI, C.B.; BARBIERI, G. - Reprodução de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na represa do Lobo (SP). Morfologia e histologia de testículo. Variação sazonal. (Pisces, Gymnotidae). Revista Brasileira de Biologia. 44: 141-148 (1984a).

BARBIERI, G.; BARBIERI, C.B. - Crescimento de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na represa do Lobo, Estado de São Paulo, pelo método da distribuição da frequência de comprimento (Pisces, Gymnotidae). Revista Brasileira de Biologia. 44(3): 239-246 (1984b).

BARBIERI, G.; BARBIERI, C.B. - Note on nutritional dynamics of *Gymnotus carapo* (L.) from the Lobo reservoir, São Paulo State, Brazil. Journal of Fish Biology. 24: 351-355 (1984c).

BARBIERI, M.C.; BARBIERI, G. - Reproduction of *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) in the dam of Lobo (SP). Morphology and histology of the ovary. Seasonal changes. (Teleostei, Gymnotidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 45(1/2): 3-12 (1985).

BARDIN, W.; CHENG, Y.; MUSTOW, N.A.; GUNSALUS, G.L. - The Sertoli cell. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed. Knobil & Neiel. Raven Press Ltda. N.York, cap.20 (1994).

BATLOUNI, S.R.; CARRENÕ, F.R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M.I. - Cell junctions in the epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatum* (Pisces, Siluriformes). *J. Mol Hist.* 36: 97-110 (2005).

BATLOUNI, S.R.; NOBREGA, R.H.; FRANÇA, L.R. - Cell junctions in fish seminiferous epithelium. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35: 207-217 (2009).

BAZZOLI, N. - Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: Godinho HP, Godinho AL (Org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco de Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas. 291-306 (2003).

BERGMANN, M.; SCHINDELMEISER, J.; GREVEN, H. - The blood-testis barrier in vertebrates having different testicular organization. *Cell Tissue Res*. 238: 145-150 (1984).

BILLARD, R.; FOSTIER, A.; WEIL, C.; BRETON, B. - Endocrine Control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Aquat.* 39: 65-79 (1982).

BILLARD, R. - Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep freezing. *Cell Tissue Res*. 233: 205-218 (1983).

BOZZO, S.; RETAMAL, C. - Geles unidimensionales. Un nuevo método densitométrico para computadores personales. *Arch. Biol. Med. Exp.* 24: R-81 (1991).

BRADFORD, M.M. - A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976).

BYERS, S.; PELLETIER, R.M.; SUAREZ-QUAN, C. - Sertoli-cell junctions and the seminiferous epithelium barrier. In: Russell LD, Griswold MD (eds.), *The Sertoli Cell*. Clearwater, FL: Cache River Press; 431-446 (1993).

MRUK, D.D. - Regulation of blood-testis barrier dynamics by focal adhesion kinase (FAK). An unexpected turn of events. *Cell Cycle.* 8(21): 3493-3499 (2009).

CHENG, C.Y.; MRUK, D.D. - A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nature Reviews. Endocrinology.* 6: 380-395 (2010).

CHENG, C.Y.; WONG, E.W.P.; YAN, H.H.N.; MRUK, D.D. - Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: New insights and advances. *Molecular and cellular Endocrinology.* 315: 49-56 (2010).

CIERESZKO, A.; PIROS, B.; DABROWSKI, K.; KUKICHARCZYK, D.; LUCZYNSKI, M.J.; DOBOSZ, S.; GLOGOWSKI, J. - Serine proteinase inhibitors of seminal plasma of teleost fish: distribution of activity, electrophoretic profiles and relation to proteinase inhibitors of blood. *Journal of Fish Biology* 53: 1292-1305 (1998).

CLERMONT, Y. - Introduction to the Sertoli cells. In: Russell, L. D.; Griswold, M. D. (ed.). *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache River Press xxii-xxv, 1993.

CRAMPTON, W.G.R. - Effects of anoxia on the distribution, respiratory strategies and electric diversity of gymnotiform fishes. *Journal of Fish Biology.* 53: 307-330 (1998).

CRAMPTON, W.G.R.; HOPKINS, C.D. - Nesting and paternal care in the weakly electric fish *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) with descriptions of larval and adult electric organ discharges of two species. *Copeia.* 1: 48-60 (2005).

DE PAULA COGNATO, D.; BERNHARDT FIALHO, C. - Reproductive biology of a population of *Gymnotus* aff. *carapo* (Teleostei: Gymnotidae) from southern Brazil. Neotropical Ichthyology. 4(3): 339-384 (2006).

DE OLIVEIRA GOMES, A.; SILVA, M.; FERRO, E.A.V. - Morfologia e Morfometria pós-natal dos testículos de *Calomys callosus* (Rodentia cricetidae). In: XXII Congresso Brasileiro de Anatomia; XXVII Congresso Chileno de Anatomia; VIII Congresso de Anatomia del Cono Sur, 2006, Florianópolis/SC. XXII Congresso Brasileiro de Anatomia; XXVII Congresso Chileno de Anatomia; VIII Congresso de Anatomia del Cono Sur (2006).

DYM, M.; FAWCETT, D.W. - The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentalization of the seminiferous epithelium. Biol Reprod. 3: 308-326 (1970).

DYM, M.; FAWCETT, D.W. - The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentalization of the seminiferous epithelium. Biol. Reprod. 3: 308-326 (1971).

DYM, M.; CAVICCHIA, J.C. - Functional morphology of the testis. Biol Reprod. 18: 1-5 (1978).

EDDY, E.M.; O'BRIAN, D.A. - The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. et al. editors. – The physiology of reproduction. N York: Raven Press. p.29-67 (1994).

FAWCETT, D.W.; LEAK, L.V.; HEIDGER, P.M. - Electron microscopy observations on the structural component of the blood-testis barrier. J. Reprod. Fert. 10: 105-122 (1970).

FRAILE, B.; SÁEZ, F.J.; VICENTINI, C.A.; DE MIGUEL, M.P.; PANIAGUA, R. - The testicular cycle of *Gambusia affinis holbrooki* (Teleostei: Poeciliidae). Journal of Zoology. 228: 115-126 (1992).

FRANCHI, E.; CAMATINI, M.; DE CURTIS, I. - Morphological evidence of a permeability barrier in urodele testis. *J. Ultrastruct. Res.* 80: 253-263 (1982).

GANDER, J.E. - Gel protein stains; glycoproteins. *Methods enzymol.* 104: 447-451 (1984).

GRIER, H.J.; LINTON, J.R.; LEATHERLAND, J.F.; DE VLAMING, V.L. - Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am. J. Anat.* 159: 331–345 (1980).

GRIER, H.J.; BURNS, J.R.; FLORES, J.A. - Testis structure in the three species of teleost with tubular gonopodia. *Copeia.* 4: 797-801 (1981).

GRIER, H.J. - Comparative organization of Sertoli cell including the Sertoli cell barrier. Cache River Press. p.703-739 (1993).

GRISWOLD, M.D. - The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell & Developmental Biologt.* 9: 411- 416 (1998).

HERMO, L.; PELLETIER, R.M.; CYR, D.G.; SMITH, C.E. - Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. *Microscopy Research and Technique.* 73: 243–278 (2010).

HOFFER, A.P.; HINTON, B.T. - Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biology of Reproduction.* 30: 991-1004 (1984).

JAMIESON, B.G.M. – *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa.* Cambridge University Press, Cambridge (1991).

JAMIESON, B.G.M.; LEUNG, L.K.P. - Introduction to fish spermatozoa and the micropyle. In: Jamieson, B. G. M. Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa Cambridge: Cambridge University Press (1991).

JOHNSON, L.; THOMPSON JR, D.L.; VARNER, D.D. - Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. Animal Reproduction Science. 105: 23-51 (2008).

KOPERA, I.A.; BILINSKA, B.; CHENG, C.Y.; MRUK, D.D. – Sertoli - germ cell junctions in the testis: a review of recent data. Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences. 365(1546): 1593-1605 (2010).

KOWALSKI, R.J.; GLOGOWSKI, D.; KUCHARCZYK, K.; GORYCZKO, S.; DOBOS, Z.; CIERESZKO, A. – Proteolytic activity and electrophoretic profiles of proteases from seminal plasma of teleosts. Journal of Fish Biology. 63: 1008-1019 (2003).

KRÓL, J.; KOWALSKI, R.; DEMSKA-ZAKĘŚ, K.; HLIWA, P.; GLOGOWSKI, J. - Proteolytic and anti-proteolytic activity in the seminal plasma of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) during the spawning period. Czech J. Anim. Sci. 56(9): 390–397 (2011).

LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 227: 680-685 (1970).

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A. - The spermatic duct of blenniid fish (Teleostei, Blenniidae): Fine structure, histochemistry and function. Zoomorphology, 110: 63-73 (1990).

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A.; WEISMANN, T. - The spermatic ducts of salmonid fishes (Salmonidae, Teleostei). Morphology, histochemistry and composition of the secretion. J. Fish Biol. 42: 79-93 (1993a).

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A.; WEISMANN, T. - The efferent duct system of the male gonads of the European pike (*Esox lucius*): testicular efferent ducts, testicular main ducts and spermatic ducts. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 25: 487–498 (1993b).

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A.; WEISMANN, T. The testicular main ducts and spermatic ducts in cyprinid fishes. I. Morphology, fine structure and histochemistry. J. Fish Biol. 44: 937-951 (1994).

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; PATZNER, R.; WEISMANN, T. - Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. Journal of Fish Biology. 47: 492–508 (1995).

LAHNSTEINER, F. - Morphology, fine structure, biochemistry, and function of the spermatic ducts in marine fish. Tissue & Cell. 35: 363–373 (2003).

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; BERGER, B. - Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Theriogenology, 62: 801–808 (2004).

LAHNSTEINER, F. - Characterization of seminal plasma proteins stabilizing the sperm viability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Reproduction Science. 97: 151-164 (2007).

LI, P.; HULAK, M.; LINHART, O. - Sperm proteins in teleostean and chondrosteian (sturgeon) fishes. Fish Physiol Biochem. 35: 567–581(2009).

LOIR, M.; SOURDAINE, P.; MENDIS-HANDAGAMA, S.M.; JEGOU, B. - Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. Micros Res Tech. 32: 533-552 (1995).

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

LÓPEZ, M.L. - Contribuição ao processo de maturação espermática em equinos (*Equus caballus*). Tese Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. (1996).

LÓPEZ, M.L.; FUENTES, P.; RETAMAL, C.; DE SOUZA, W. - Regional differentiation of the blood-epididymis barrier in stallion (*Equus caballus*). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 29(3): 353-363 (1997).

LOU, Y.H.; TAKAHASHI, H. - The blood-testis barrier and its breakdown following immunization to testis material in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Cell Tissue Res.* 258: 491-498 (1989).

LOVEJOY, N.R.; LESTER, K.; CRAMPTON, W.G.R.; MARQUES, F.P.L.; ALBERT, J.S. - Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 54: 278-290 (2010).

MAGALHÃES, A.L.B.; BAZZOLI, N.; SANTOS, G.B.; RIZZO, E. - Reproduction of the South American dogfish characid, *Galeocharax knerii*, in two reservoirs from upper Paraná River basin, Brazil. *Environmental Biology of Fishes.* 70: 415-425 (2004).

MAGO-LECCIA, F. - Electric fishes of continental waters of America. *Biblioteca de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas Y Naturales.* Caracas, Venezuela. p.206 (1994).

MANNI, L.; RASOTTO, M.B. - Ultrastructure and histochemistry of the testicular efferent duct system and spermiogenesis in *Opistognathus whitehurstii* (Teleostei, Trachinoidei). *Zoomorphology* 117: 93-102 (1997).

MARCAILLOU, C.; SZRLLRSI, A. - The "blood-testis" barrier in a nematode and a fish: a generalizable concept. *J. Ultrastruct. Res.* 70:128-136 (1980).

MATTEI, X. - Spermiogenése comparé des poisson. In: Baccetti, B. (Ed.). *Comparative Spermatology*. Academic Press. 57-72 (1970).

MATTEI, X. - Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Can. J. Zool.* 69: 3038-3055 (1991).

MATTEI, X.; SIAU, Y.; THIAW, O.T.; THIAM, D. - Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion sp.* (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. *J. Fish Biol.* 43(6): 931-937 (1993).

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. - Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* 25(5): 747-806 (2004).

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. - Tight junctions in the testis: new perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* 365: 1621-1635 (2010).

MUÑOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET, S. - Testicular structure and semicyclic spermatogenesis in a specialized ovuliparous species: *Scorpaena notata* (Pisces, Scorpaenidae). *Acta Zoologica.* 83: 213-219 (2002).

NICHOLLS, T.J.; GRAHAM, G.P. - The ultrastructure of lobule boundary cell and Leydig cell homologs in the testis of a cichlid fish, *Cichlossoma nigrofasciatum*. *Gen. Com. End.* 19: 133-146 (1972).

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

PARENTI, L.R.; GRIER, H.J. - Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.* 44: 333–348 (2004).

PARMENTIER, H.K.; BOOGAART, J.G.M. VAN DEN; TIMMERMANS, L.P.M. – Physiological compartmentation in gonadal tissue of the common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Cell Tissue Res.* 242: 75-81(1985).

PFEIFFER, D.C.; VOGL, A.W. - Actin-related intercellular junctions in the germinal compartment of the testis in *Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae). *Zoomorphology.* 114: 177-184 (1994).

PFEIFFER, D.C.; VOGL, A.W. - Actin-related intercellular adhesion junctions in the germinal compartment of the testis in the hagfish (*Eptatetrus stouti*) and lamprey (*Lampetra tridentatus*). *Tissue Cell.* 34(6): 450-459 (2002).

PHILLIPS, B.T.; GASSEI, K.; ORWIG, K.E. - Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365: 1663-1678 (2010).

POINTIS, G.; GILLERON, J.; CARETTE, D.; SEGRETAIN, D. - Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365: 1607-1620 (2010).

PUDNEY, J. - Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. *River Press.* p.612-657 (1993).

PUDNEY, J. - Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microscopy Research and Technique.* 32(6): 459-497 (1995).

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

REISNER, A.H. - Gel protein stain: A rapid procedure. *Met. Enzimol. Part C.* p.439-441 (1984).

RESENDE, E.K. de. - Estudos biológicos da *Gymnotus carapo* e *Rhamphichthys cf. marmoratus* no Pantanal. Relatório final do projeto nº 01.0.94.572.03. Corumbá: Embrapa Pantanal. p.17 (não publicado) (1999).

RESENDE, E.K. de.; PEREIRA, R.A.C. - Dieta alimentar de *Gymnotus cf. carapo*, (Ostariophysi, Gymnotiformes), na planície inundável do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SOCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, Corumbá. Os desafios do novo milênio - resumos. Corumbá: Embrapa Pantanal. 3: 285 (2000).

RESENDE, E.K. de. - A pesca em águas interiores. Disponível em <http://www.cpap.embrapa> – publicações online (2006).

RETAMAL, C.; URZUA, J.; ALVES, E.W.; LOPEZ, M.L. – Cytochemical and electrophoretic study of stallion epididymal glycoproteins. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 32(1): 117-130 (2000).

REYNOLDS, E.S. - The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of cell Biology.* 17: 208-212 (1963).

ROTTA, M.A. - Aspectos Biológicos e Reprodutivos para a Criação da Tuvira (*Gymnotus sp.*) em Cativeiro - I. Corumbá: Embrapa Pantanal. p.30 (2004). (Documentos / Embrapa Pantanal ISSN 1517-1973; 74).

RUSSELL, L. - Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.* 148: 313-328 (1977).

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. - Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, FL: Cache River Press ed. U.S.A. (1990).

SCHULZ, R.W.; FRANÇA, L.R.; LAREYRE, J.J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R.H.; MIURA, T. - Spermatogenesis in fish. General and Comparative Endocrinology. 165: 390-411 (2010).

SHARPE, R.M. - Paracrine control of the testis. Clin. Endocrinol. Metab. 15(1): 185-207 (1986).

SHIBATA, N.; HAMAGUCHI, S. - Electron microscopic study of the blood-testis barrier in the teleost, *Oryzias latipes*. Zool Sci. 3: 331-338 (1986).

SILVA, M.; GODINHO, H.P. - Barreira hematotesticular em *Oreochromis niloticus* (Peixe, teleósteo). Rev. Bras. Cien. Morfol. 6(1): 9-13 (1989).

SILVA, J.M.; OLIVEIRA, J.I.J. de. - Morfologia do intestino do “tuvira” *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) (Pices: Gymnotidae). Revista Científica, UFMS, Campo Grande. 4(1): 18-22 (1997a).

SILVA, J.M.; OLIVEIRA, J.I.J. de. - Morfologia do esôfago do “tuvira” *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) (Pices: Gymnotidae). Revista Científica, UFMS, Campo Grande. 4(1): 23-28 (1997b).

SILVA, J.M.; OLIVEIRA, J.I.J. de. - Morfologia do estômago do “tuvira” *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) (Pices: Gymnotidae). Revista Científica, UFMS, Campo Grande. 4(1): 29-34 (1997c).

SILVA, A.; QUINTANA, L.; GALEANO, M.; ERRANDONEA, P. - Biogeography and breeding in Gymnotiformes from Uruguay. Environmental Biology of Fishes. 66: 329-338 (2003).

SIU, M.K.; CHENG, C.Y. - Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 71(2): 375-391 (2004).

SPRANDO, R.L.; RUSSELL, L. - Germ cell-somatic cell relationships: a comparative study of intercellular junctions during spermatogenesis in selected non-mammalian vertebrates. *Scanning Microscopy.* 1: 1249-1255 (1987).

STEED, E.; BALDA, M.S.; MATTER, K. - Dynamics and junctions of tight junction. *Trends in Cell Biology.* 20(3): 142-149 (2010).

STEYN, G.J.; VAN VUREN, E.J.H.J. – The role of the blood-testis barrier in the chemical composition of the seminal plasma of the freshwater teleost *Clarias gariepinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83(3): 421-425 (1986).

THEODORO, E. - Caracterização Sócio-Econômica na Atividade de Coleta e Comercialização de Isca Viva na BAP-MTIn: PROJETO IMPLEMENTAÇÃO DE PRÁTICAS DE GERENCIAMENTO INTEGRADO DE BACIA HIDROGRÁFICA PARA O PANTANAL E BACIA DO ALTO PARAGUAI. Resumo Executivo do Relatório Final. Cuiabá. ANA/GEF/PNUMA/OEA – FEMA/MT, p.27 (2003).

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. - Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2: 285-293 (2001).

USHIZIMA, T.T.; BOCK, C.L. - Definição de Características Sexuais Secundárias em *Gymnotus* aff. *carapo* (Teleostei, Gymnotidae). Influência da indução hormonal como técnica de preparação artificial. In: USHIZIMA, THIAGO TETSUO. Relatório do Estágio Curricular Supervisionado. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em zootecnia) - Universidade de São Paulo, Pirassununga (2000).

VAZZOLER, A.E.A.M. - Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá, Editora da Universidade, p.169 (1996).

VILJOEN, B.C.S.; VAN VUREN, E.J.H.J. - Regulation of the physical and biochemical composition of blood-testis barrier in *Labeo Ruddi* and *Labeo Rosae* (Pisces: Cyprinidae). *Comp.Biochem.Physiol.* 103A(2): 253-257 (1992).

VLOK, W.; VAN VUREN, E.J.H.J. - Chemical composition of blood and seminal plasma of *Barbus aeneus* (Cyprinidae). *Comp. Biochem. Physiol* 90(1): 49-51 (1988).

VOGL, A.W.; PFEIFFER, D.C.; MULHOLLAND, D.; KIMEL, G.; GUTTMAN, J. - Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: Ectoplasmic specializations. *Arch Histol Cytol.* 63: 1-15 (2000).

WESTBY, G.W.M. - Comparative studies of the aggressive behaviour of two Gymnotid electric fish (*Gymnotus carapo* and *Hypopomus artedi*). *Animal Behaviour.* 23: 192-213 (1975).

YAN, H.H.N.; MRUK, D.D.; WONG, E.W.P.; LEE, W.M.; CHENG, C.Y. - An autocrine axis in the testis that coordinates spermiation and blood–testis barrier restructuring during spermatogenesis. *Cell Biology.* 105 (26): 8950–8955 (2008).