

ESPERMATOGÊNESE E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS GÔNADAS DE HEPTAPTERIDAE E PSEUDOPIMELODIDAE (TELEOSTEI, SILURIFORMES).

SPERMATOGENESIS AND MORPHOLOGIC ASPECTS OF THE GONADS IN HEPTAPTERIDAE AND PSEUDOPIMELODIDAE (TELEOSTEI, SILURIFORMS).

Talita Sarah Mazzoni; Irani Quagio-Grassiotto

Ciências Biológicas - Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências

UNESP – BOTUCATU-SP

email: talitasarah@yahoo.com.br

RESUMO

Em Siluriformes, o aparelho reprodutor masculino é extremamente diversificado, exibindo desde órgãos saculiformes até testículos franjados. Em algumas famílias, os testículos podem ser constituídos somente por franjas espermatogênicas, ou apresentarem franjas secretoras na região caudal, ou ainda estruturas acessórias (estrutura em favo de mel ou ampola) que não têm nenhuma atividade espermatogênica. O conhecimento das diferenças anatômicas entre os aparelhos reprodutores masculinos de Siluriformes pode contribuir para entender a evolução gonadal e auxiliar em análises filogenéticas nestas espécies. Para isto, foi proposto uma análise morfológica comparativa do sistema reprodutor masculino de Pseudopimelodidae e Heptapteridae, considerados antigamente como Pimelodidae. Machos adultos de Heptapteridae (*Pimelodella gracillis*, *Imparfinis* sp., *Cetopsorhamdia* sp.) e de Pseudopimelodidae (*Microglanis* sp.) foram coletados mensalmente nos rios do município de Botucatu-SP. Os animais foram anestesiados e sacrificados para a retirada dos testículos, os quais foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0.1M, pH 7.3, por pelo menos 24 horas. O material foi desidratado e processados para a inclusão em historesina Technovit 7100 (Jung HistoResin). As seções de 3µm foram coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) + Hematoxilina + Metanil Yellow. Os testículos das espécies analisadas são órgãos pares, que apresentam franjas em toda a sua extensão, as quais se projetam ventralmente ao longo de duas bases dorsais. Essas bases testiculares apresentam um ducto principal que se unem para formar o ducto espermático único, o qual se comunica com a papila urogenital. Nos cortes histológicos, os testículos das espécies analisadas compartilham um mesmo padrão de organização. As franjas da porção cranial do testículo apresentam atividade espermatogênica com um compartimento germinativo do tipo tubular anastomosado. Na porção caudal dos testículos algumas franjas mostram-se estritamente secretoras, as quais acumulam, na luz dos túbulos seminíferos, uma secreção de provável natureza protéica. Exceto em Heptapteridae, as franjas secretoras de Pseudopimelodidae diferem-se nitidamente pela sua coloração translúcida, além de serem mais alongadas e arredondadas. Este

trabalho descreve a morfologia do aparelho reprodutor masculino dos “antigos” Pimelodidae (Heptapteridae e Pseudopimelodidae), que associada a outras características como biologia molecular, torna-se útil para o entendimento da filogenia do grupo.

Palavras-chave: Siluriformes, Testículo, Sistema Reprodutor

ABSTRACT

In Siluriforms, the male reproductive system is extremely diversified, exhibiting since saculiform-paired organs to fringed testis. In some families, the testes can be constituted only by spermatogenic fringes, or have secretory fringes in the caudal region, or even accessory structures (honeycomb-like structure or ampulla) that have no spermatogenic activity. The knowledge of the anatomical differences between the male reproductive systems of Siluriforms may contribute to understand the gonadal evolution and to help in phylogenetic analyses in these species. For this reason, we propose to evaluate comparatively the morphology of the male reproductive system in the Pseudopimelodidae and Heptapteridae, that are grouped in Pimelodidae. Sexually mature males of Heptapteridae (*Pimelodella gracilis*, *Imparfinis* sp., *Cetopsorhamdia* sp.) and Pseudopimelodidae (*Microglanis* sp.) were monthly collected in rivers and streams of the municipal district of Botucatu-SP. The animals were anaesthetized, sacrificed and their testes were quickly removed and immersed in 2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in Sorensen phosphate buffer (0.1M, pH 7.2) for at least 24 hours. The material was dehydrated and embedded in resin Technovit 7100 (Jung HistoResin). Sections of 3µm were stained with Schiff's periodic acid (PAS)+Hematoxylin+Metanil yellow. In the studied species, the testis is composed of a variable number of fringes more or less elongated and with different formats. The fringes are connected to the main testicular ducts (right and left) that are joined, at the posterior region of the testis, forming a common spermatic duct, which extends to the urogenital papillae. Among the species, the comparative histology reveals a common testicular structure: the cranial fringes are spermatogenic, showing a tubular anastomosing germinal epithelium; and the caudal fringes are strictly secretory with PAS negative secretion. Anatomically, the testicular fringes of related species present differences in color, number and format. Except in Heptapteridae, the secretory fringes in Pseudopimelodidae are easily distinguished by the anatomy. These secretory fringes are more elongated, rounded and with white or translucent coloration. This work describes the morphology of the male reproductive system in the “old” Pimelodidae (Heptapteridae and Pseudopimelodidae) available informations that added to traditional characters (osteology, biometry and molecular biology) can be useful to understand the phylogeny of the group.

Keywords: Siluriforms, Testis, Reproductive System

INTRODUÇÃO

A ordem Siluriformes compreende um grupo de peixes extremamente grande, diverso e amplamente distribuído nas regiões tropicais de todo o mundo. Os peixes dessa ordem, em geral, habitam o fundo dos rios, permanecendo entre as rochas e a vegetação. Possuem formas e tamanhos extremamente variados, com hábitos predominantemente crepusculares e noturnos.

O corpo desprovido de escamas pode ser revestido por uma pele espessa, popularmente conhecida como couro, ou então, coberto total ou parcialmente com placas ósseas; geralmente possuem três pares de barbilhões, provavelmente utilizados para localizar alimentos no fundo e orientar sua natação.

Apesar de bastante estudadas, as hipóteses de relacionamento entre as várias famílias de Siluriformes são ainda contraditórias. Por exemplo, em contraste com o consenso geral sobre a família Diplomystidae como o grupo irmão de todos os outros Siluriformes, as hipóteses de relacionamento de Pimelodidae, Heptapteridae e Pseudopimelodidae com as outras famílias de Siluriformes não são robustas. Reconhecidas antes como subfamílias de Pimelodidae, Pimelodinae, Pseudopimelodinae e Heptapterinae são aceitas hoje como famílias (Pimelodidae, Pseudopimelodidae e Heptapteridae).

Nos Teleostei, e particularmente nos Siluriformes, o aparelho reprodutor masculino pode apresentar uma série de diferenciações. Os testículos variam de simples bolsas alongadas que convergem para a papila genital, a órgãos compostos por várias franjas com função predominantemente espermatogênica, contendo regiões diferenciadas com função secretora ou armazenadora de esperma. Alguns grupos chegam inclusive a apresentar estruturas similares em função a vesículas seminais, as ampolas. A presença de regiões diferenciadas nos testículos e estruturas anexas no aparelho reprodutor parece conter traços filogenéticos.

Apesar da potencial aplicabilidade deste tipo de dado para o conhecimento das relações de parentesco entre as espécies, informações sobre a anatomia testicular e seus anexos encontram-se disponíveis apenas em algumas das famílias de Siluriformes.

Nos Teleostei, a organização do compartimento germinativo no interior dos testículos - em lóbulos ou em túbulos - também encerra informações de caráter filogenético. Nos testículos lobulares, o compartimento germinativo termina em fundo cego e com formato de dedos voltados para baixo. Pode sofrer anastomoses, porém apenas na região do ducto principal. Esse tipo de organização testicular é encontrado nos Teleostei mais derivados, Percomorpha e Atherinomorpha. Nos testículos tubulares, o compartimento germinativo termina em forma de alças. Nos Teleostei mais basais, os túbulos sofrem anastomoses em diferentes alturas do órgão, principalmente na região do ducto espermático. Esse último tipo de organização testicular é denominado de tubular anastomosado.

A anatomia, organização do compartimento germinativo, diferenciações e anexos testiculares são tidos como caracteres bastante úteis para a identificação dos padrões de relacionamento inter familiar e parecem ter aplicação nos estudos filogenéticos. Considerando: a) o novo status familiar de Pseudopimelodidae, Pimelodidae e Heptapteridae e b) que descrições mais detalhadas sobre o aparelho reprodutor masculino dessas famílias restringem-se a poucos representantes ou não se encontram disponíveis, pretendeu-se descrever tais caracteres em *Microglanis* sp (Pseudopimelodidae); *Rhamdia quelen* e *Pimelodella gracillis* (Heptapteridae), *Cetopsorhamdia* sp e *Imparfinis* sp (também Heptapteridae, pertencentes à subfamília Heptapterinae) e compará-los com dados já existentes para os Pimelodidae, de forma a ampliar as informações existentes sobre este grupo de animais. Essas informações podem vir a compor um novo conjunto de caracteres que associado a outros sistemas (morfológicos, citogenéticos, moleculares, espermatológicos) venha a ser utilizado nas análises das relações dessas famílias entre si e com os demais Siluriformes.

METODOLOGIA

Machos adultos de *Pimelodella gracillis*, *Rhamdia quelen*, *Imparfinis* sp., *Cetopsorhamdia* sp. e *Microglanis* sp. foram coletados mensalmente em riachos do município de Botucatu-SP. Os animais foram anestesiados em solução de benzocaína 0,1% e foi realizada uma incisão ventro-mediana para retirada das gônadas.

Os testículos retirados foram fixados inteiros em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0.1M, pH 7.3, por pelo menos 24 horas, fotografados e processados para a inclusão em historesina, no Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. As secções, com 3µm de espessura, foram obtidas em micrótomo equipado com navalha de vidro. Os cortes histológicos obtidos foram corados em Hematoxilina Férrica/Eosina (H.E.) e PAS + Hematoxilina + Metanil Yellow (MY) para análise da organização do compartimento germinativo, diferenciações e anexos testiculares. O material foi analisado em estereomicroscópio e ao microscópio fotônico. A documentação fotográfica foi realizada por captura digital.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testículos dos Heptapteridae e Pseudopimelodidae analisados são órgãos pares, que apresentam franjas em toda a sua extensão, as quais se projetam ventralmente ao longo de duas bases dorsais. Essas bases testiculares apresentam um ducto principal que se unem para formar o ducto espermático único, o qual se comunica com a papila urogenital. Anatomicamente, esses

testículos apresentam diferenças quanto à região de confluência testicular, número e formato das franjas (Fig. 1 a 5).

Em *Pimelodella gracillis* os testículos são formados por uma grande quantidade de franjas alongadas e suas bases dorsais confluem na região mediana. Já em *Imparfinis* sp. as franjas apresentam um formato triangular e estão em número reduzido, sendo que as franjas da porção cranial são maiores que as da porção caudal. Assim como em *Cetopsorhamdia* sp., os testículos de *Imparfinis* sp. são unidos ao longo de todo o seu comprimento, separados somente na porção cranial. Porém, em *Cetopsorhamdia* sp. as franjas mostram-se alongadas, semelhante às franjas de *Pimelodella gracillis*, mas estão presentes em uma quantidade muito maior. Já os testículos de *Microglanis* sp., único representante dos Pseudopimelodidae analisado, apresentam franjas alongadas e de número variável. Diferentemente dos Heptapteridae, as franjas caudais dos Pseudopimelodidae, ou seja, as franjas secretoras, diferem-se nitidamente das franjas craniais pela sua coloração translúcida. Na região mediana, as bases dorsais dos testículos confluem e convergem para a região caudal.

Tanto em Heptapteridae como em Pseudopimelodidae os testículos são envoltos por uma túnica albugínea de natureza conjuntiva, que emite septos para o interior das franjas formando um tecido intersticial. No interior dos túbulos seminíferos, as células de Sertoli associam-se a uma célula germinativa, a espermatogônia primária, dando origem a um cisto onde ocorre a gametogênese (Fig. 6, 8). As espermatogônias primárias são as maiores células da linhagem germinativa, têm forma esférica ou oval, núcleo volumoso e central com cromatina finamente granulada. Apresentam um só nucléolo, geralmente excêntrico, bastante evidente. As espermatogônias primárias sofrem divisão celular, originando as espermatogônias secundárias, as quais são menores do que as primárias. Nos cistos, encontram-se em grupos de número variável e possuem núcleo esférico com cromatina finamente granulada. Apresentam dois ou mais nucléolos e citoplasma de contorno irregular. Os espermatócitos, menores que as espermatogônias, têm núcleo basofílico com cromatina compacta e não apresentam nucléolo. Após o término da meiose, dão origem às espermátides. As espermátides são pequenas células esféricas com citoplasma muito reduzido. Seu núcleo, com cromatina em compactação, decresce gradualmente em diâmetro ao longo do processo de diferenciação, dando origem aos espermatozóides. Os espermatozóides são as menores células germinativas. Caracterizam-se por apresentar um longo flagelo e núcleo arredondado, com cromatina bastante compacta, que se cora intensa e homogeneamente. São basofílicos e estão presentes no lúmen dos túbulos seminíferos.

Nos cortes histológicos, os testículos das espécies analisadas compartilham um mesmo padrão de organização. As franjas da porção cranial do testículo apresentam atividade espermatogênica com um compartimento germinativo do tipo tubular anastomosado (Fig. 7, 9, 10,

12, 13, 14, 15). O epitélio dos túbulos seminíferos é constituído pelas células germinativas e pelas células de Sertoli, organizadas em cistos, os quais se encontram em diferentes fases da espermatogênese. Conforme as células germinativas finalizam a diferenciação, os espermatozóides são liberados na luz do compartimento germinativo. Assim, as franjas espermatogênicas tornam-se gradativamente armazenadoras. Na porção caudal dos testículos algumas franjas mostram-se estritamente secretoras, as quais acumulam, na luz dos túbulos seminíferos, uma secreção de provável natureza protéica (Fig. 11, 16). Somente em *Rhamdia quelen* não foi observada diferença entre as franjas caudais e craniais, portanto, aparentemente todas as franjas apresentam atividade espermatogênica (Fig. 9). Porém não se pode fazer tal afirmação uma vez que o número de exemplares estudados foi muito reduzido.

CONCLUSÕES

Foi possível observar que os testículos das cinco espécies estudadas neste trabalho apresentam projeções digitiformes ou franjas, igualmente relatadas em outros Siluriformes. Apesar do aspecto franjado, estes testículos apresentam túbulos seminíferos com células espermatogênicas organizadas em cistos, similares aos observados na maioria dos teleósteos. As células germinativas, nestas espécies, têm desenvolvimento sincrônico, de modo que em cada cisto todas as células encontram-se numa mesma fase. Entretanto, a composição das células germinativas é variável entre as franjas. Além disso, Heptapteridae (*Pimelodella gracillis*, *Rhamdia quelen*, *Imparfinis* sp. e *Cetopsorhamdia* sp.) e Pseudopimelodidae (*Microglanis* sp.) compartilham o mesmo tipo de organização interna de compartimento seminífero, na forma tubular anastomosada e apresentam distribuição irrestrita das espermatogônias ao longo dos túbulos seminíferos. Tais características são inerentes aos grupos de peixes mais basais, caso dos Ostaryophisi, superordem à qual pertencem os Siluriformes.

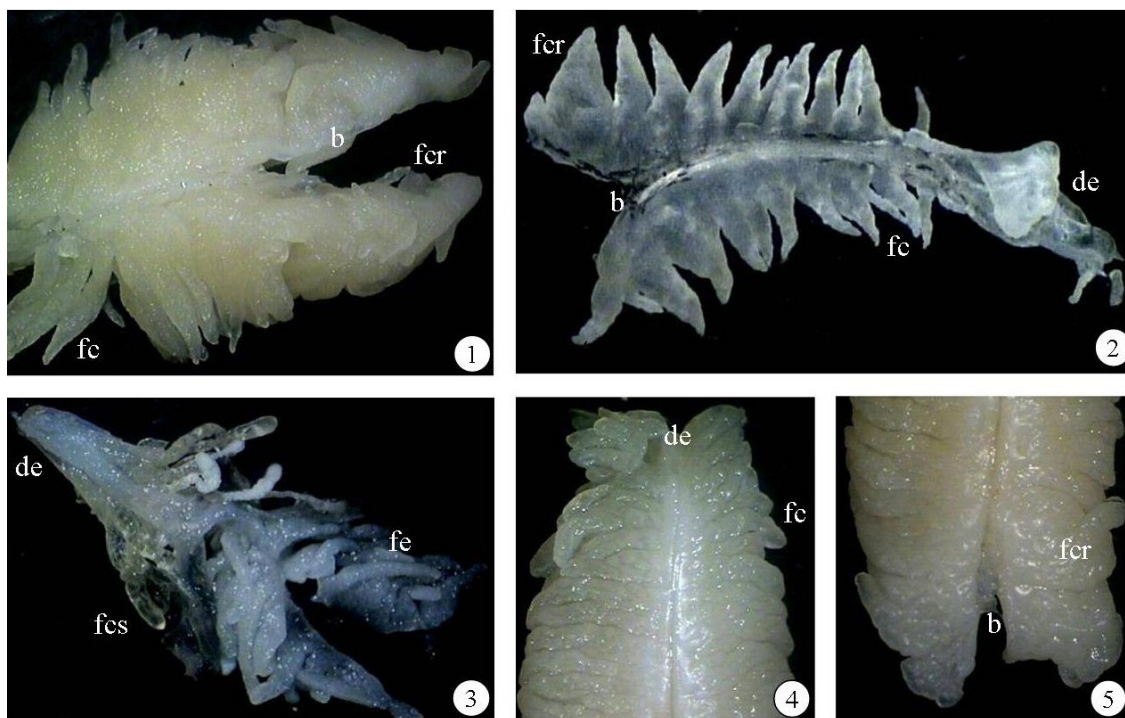
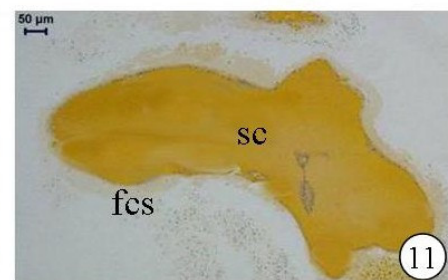
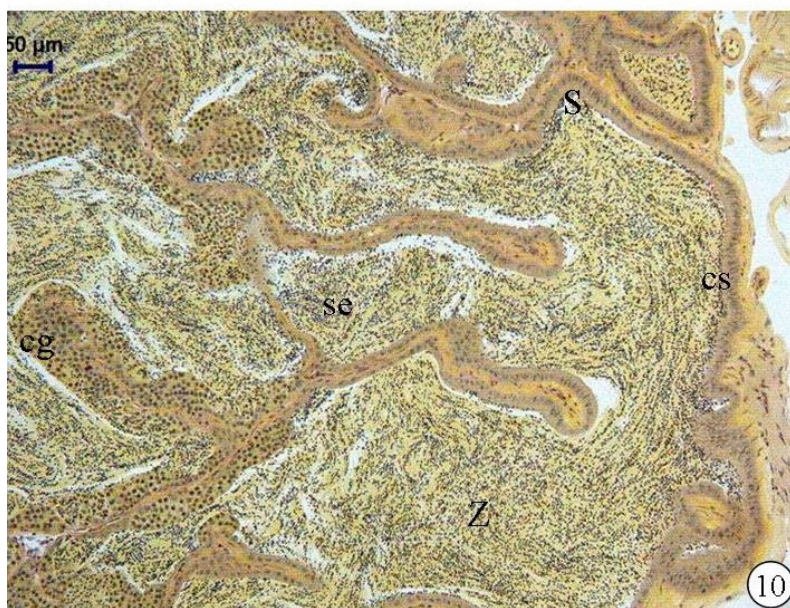
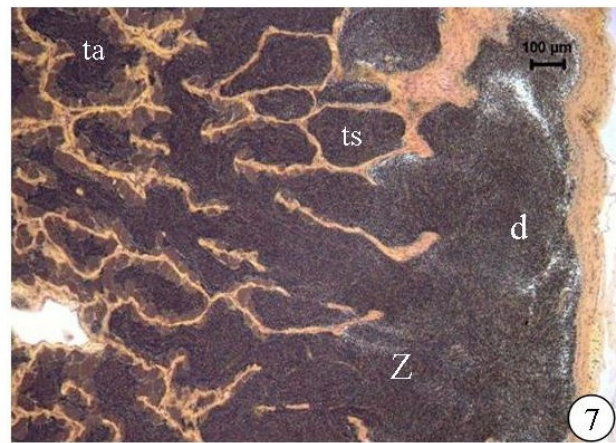
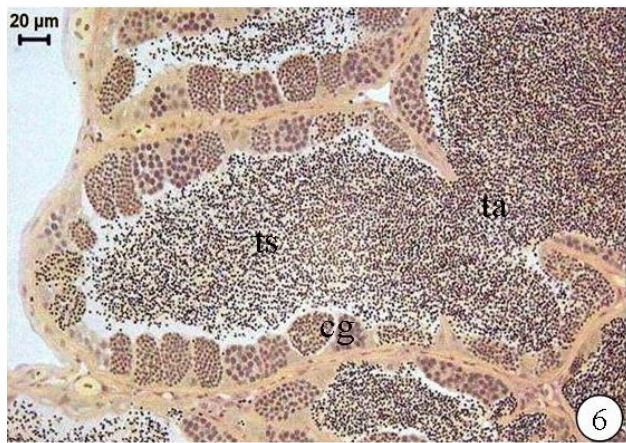


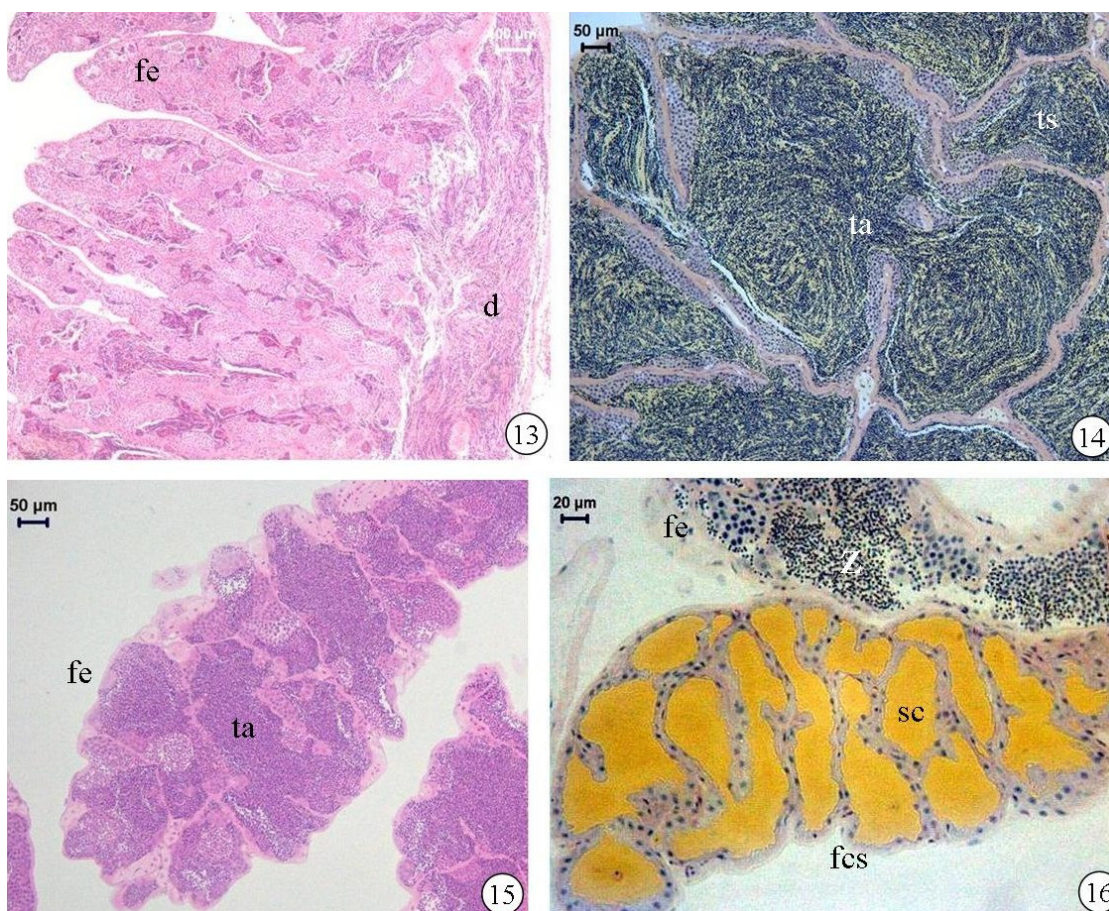
Fig. 1: Testículo de *Pimelodella gracillis* – vista dorsal; Fig. 2: Testículo de *Imparfinis* sp – vista dorsal; Fig. 3: Testículo de *Microglanis* sp – vista dorsal; Fig. 4: Testículo de *Cetopsorhamdia* sp – vista dorsal, porção caudal; Fig. 5: Testículo de *Cetopsorhamdia* sp – vista dorsal; porção cranial.

Legenda: fcr = franjas craniais; fc = franjas caudais; fcs = franjas caudais secretoras; fe = franja espermatogênica; b = base testicular; de = ducto espermático



Cortes histológicos de testículo de: *Pimelodella gracillis* Fig. 6: Túbulo seminífero anastomosado (Coloração MY); Fig. 7: Franja armazenadora e ducto principal (Coloração MY); *Rhamdia quelen* Fig. 8: Túbulo seminífero (Coloração MY); Fig. 9: Franjas espermatogênicas (Coloração MY); *Imparfinis* sp Fig. 10: Franja espermatogênica armazenadora (Coloração MY); Fig. 11: Porção de uma franja secretora (Coloração MY); Fig. 12: Franja espermatogênica (Coloração MY)

Legenda: fe = franja espermatogênica; fcs = franjas caudais secretoras; d = ducto principal; ts = túbulo seminífero; ta = túbulos seminíferos anastomosados; cg = compartimento germinativo; G = espermatogônia; C = espermatócito; Z = espermatozoides; cs = células secretoras; sc = secreção; S = célula de Sertoli; se = seio espermático



Cortes histológicos de testículo de: *Cetopsorhamdia* sp Fig. 13: Franjas espermatogênicas e ducto principal (Coloração HE); Fig. 14: Túbulos seminíferos anastomosados (Coloração MY); *Microglanis* sp Fig. 15: Franja espermatogênica (Coloração HE); Fig. 16: Franja secretora (Coloração MY)

Legenda: fcs = franjas caudais secretoras; fe = franja espermatogênica; d = ducto principal; ts = túbulo seminífero; ta = túbulos seminíferos anastomosados; sc = secreção

AGRADECIMENTOS

Ao mestrando Rinaldo José Ortiz, pela ajuda neste trabalho, aos colegas do Laboratório de Reprodução de Peixes Neotropicais do Depto de Morfologia da Unesp – Botucatu, aos técnicos Ricardo e Vicente pelas ajudas na coleta e processamento do material.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOCKMANN, F.A. & GUAZZELLI, G.M. (2003). Family Heptapteritidae (Heptapterids). In *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, Jr C.J., orgs.), pp. 406-431. Porto Alegre: Edipucrs.
- CRUZ, R.J.G. & SANTOS, J.E. (2004). Testicular structure of three species of neotropical freshwater pimelodids (Pisces, Pimelodidae). *Revista Brasileira de Zoologia* **21**: 267-271.
- DIOGO, R. (2003). Higher-level phylogeny of Siluriformes – An overview. *Voprosy Iktiologii* **31**: 143-148.

- FERRARIS, C. J. & DE PINNA, M. C. (1999). Higher Level Names for Catfishes (Actinopterygii: Ostariophysi: Siluriformes). *Proceedings of the California Academy of Sciences*. Vol 51, **1**: 1-17.
- GRIER, H.J. (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.* **21**: 345-357.
- GRIER, H.J. (1992). Chordate Testis: The extracellular matrix hypothesis. *The Journal of Experimental Zoology*, **261**: 151-160
- GRIER, H. J. (1993). Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In *The Sertoli cell* (Russel, L.D. & Griswold, M.D. eds.), Cache River Press, Florida, pp.704-730.
- LOIR, M.; CAUTY, C.; PLANQUETTE, P. & LE BAIL, P. (1989). Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes. *Aquat. Living Resour.*, **2**: 45-56.
- LUNDBERG, J.G. & LITTMANN, M.W. (2003) Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, Jr C.J., orgs.), . Porto Alegre: Edipucrs, pp. 432-446
- MEISNER, A.D.; BURNS, J.R.; WEITZMAN, S.H. & MALABARBA, L.R. (2000). Morphology and histology of the male reproductive system in two species of internally inseminating South American catfishes, *Trachelyopterus lucenai* and *T. galeatus* (Teleostei: Auchenipteridae). *Journal of Morphology* **246**: 131-141.
- PARENTI, L.R.; GRIER, H.J. (2004). Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes. *Integr. Comp. Biol.* **44**: 333-348.
- de PINNA, M.C. (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, pp. 279-330.
- SANTOS, J.E.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. & SANTOS G.B. (2004). Reproduction of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken) (Pisces, Siluriformes) in Furnas reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **21**: 193-200.
- SNEED, K.E.; CLEMENS, H.P. (1963). The morphology of the testes and accessory reproductive glands of the catfishes (Ictaluridae). *Copeia*, **4**: 606.
- TEUGELS, G.G. (1996). Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei); an overview. *Aquat. Living Resour.* **9**: 9-34.