

MORFOLOGIA DOS CARACTERES REPRODUTIVOS EM *Astyanax* sp. (TELEOSTEI: CHARACIFORMES) E SUAS IMPLICAÇÕES FILOGENÉTICAS.

MORPHOLOGY OF THE REPRODUCTIVE CHARACTERS OF *Astyanax* sp. (TELEOSTEI: CHARACIFORMS) AND ITS PHYLOGENETIC IMPLICATIONS.

André Santachiara Fossaluza¹, Irani Quagio-Grassiotto²

¹ Graduando em Ciências Biológicas – Instituto de Biociências – Campus de Botucatu – dehfo@hotmail.com, ² Professora-Doutora – Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – Campus de Botucatu – iraniqg@yahoo.com.br

RESUMO

Os gêneros *Incertae sedis* em Characidae, onde se encontra classificado o gênero *Astyanax* atualmente, constituem um imenso e heterogêneo conjunto de peixes, predominantemente pequenos, abundantes em rios e outros habitats aquáticos da região neotropical. Neste grupo são inúmeros os problemas taxonômicos e filogenéticos. O conhecimento das relações de parentesco entre os Characiformes e conseqüentemente entre os Characidae tem por base características osteológicas e de partes moles, além de dados moleculares. Sabe-se que o aparelho reprodutor masculino, a espermiogênese e os espermatozóides das diferentes espécies apresentam características que podem conter traços a serem úteis nas análises cladísticas. Considerando a potencial aplicabilidade dos caracteres reprodutivos no estudo das relações de parentesco entre as espécies, descreve-se aqui a organização estrutural do aparelho reprodutor masculino e a morfologia das células germinativas presentes na gônadas de representantes do gênero *Astyanax*.

Palavras-Chave: espermatozóides, Characidae, espermatogênese, *Incertae sedis*.

ABSTRACT

The genera *Incertae sedis* in Characidae, where is found the genera *Astyanax* nowadays, are composed by a huge and heterogeneous group of fishes, mainly small, very common in rivers and other aquatic habitats from the neotropical area. In this group there are plenty of taxonomic and phylogenetic problems. The knowledge about the relationships among the Characiforms and consequently among the Characidae is based on bone and soft parts characteristics, beyond molecular data. It is known the male reproductive system, the spermiogenesis and the spermatozooids from the different species pursue characteristics that may have useful clues for the

cladistic analysis. Considering the potential applicability of the reproductive characters in the study of the relationships among the species, it is described here the structural organization of the male reproductive system and the morphology of the germinative cells found in the gonads of representatives from the genera *Astyanax*.

Keywords: spermatozoids, Characidae, spermatogenesis, *Incertae sedis*.

INTRODUÇÃO

Os estudos sistemáticos dos peixes neotropicais, com base em dados morfológicos têm-se expandido consideravelmente nos últimos anos (ver referências em Malabarba *et al.*, 1998), principalmente após a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados. Entre estas técnicas está o uso da metodologia de análise filogenética, proposta inicialmente por Hennig (1966) e implementado por diversos autores. Apesar dos notáveis progressos, muito ainda resta a ser conhecido sobre a filogenia dos diversos grupos, devido à imensa magnitude da biodiversidade neotropical.

Dentro de Characiformes os maiores problemas taxonômicos e filogenéticos ocorrem em grupos de porte pequeno, com menos que 15 cm de comprimento padrão e primariamente pertencentes à família Characidae, grupo dominante na ordem em termos de diversidade taxonômica.

Embora o conhecimento atual sobre o padrão de relacionamento entre os Characiformes tenha sido inferido com base em caracteres morfológicos, outros dados parecem ser potencialmente úteis no estudo do grupo. Várias das características reprodutivas das espécies podem conter traços filogenéticos. A estrutura gonadal dos Teleostei, por exemplo, mostra diferenças marcantes entre os grupos mais basais e os grupos mais derivados, os Neoteleostei (Parenti & Grier 2004).

Nos Teleostei, a organização do compartimento germinativo no interior dos testículos - em lóbulos ou em túbulos - também encerra informações de caráter filogenético (Parenti & Grier, 2004). 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 (Grier, 1993).

Parenti e Grier (2004) num levantamento recentemente concluído sobre a estrutura testicular nos Teleostei, contabilizando 136 descrições, confirmam esses dados. Nesse banco,

surpreendentemente, os Ostariophysi (superordem à qual pertencem os Characiformes) com 75% das espécies de peixes de água doce do mundo (Fink & Fink, 1981), representam apenas 5,8% das 136 descrições existentes.

OBJETIVOS

Dado o potencial de aplicabilidade das informações sobre a estrutura do aparelho reprodutor, a morfologia fina da gametogênese e das células germinativas masculinas para os estudos filogenéticos dos Teleostei e considerando-se os gêneros Incertae Sedis em Characidae descreve-se aqui:

- a organização estrutural dos testículos de representantes do gênero *Astyanax* ;
- a morfologia das células germinativas e somáticas que compõe o sistema reprodutor masculino de representantes deste gênero;

METODOLOGIA

Para tal, durante os meses de março e setembro de 2006 foram coletados 20 espécimes de representantes das espécies *Astyanax altiparanae* e *Astyanax fasciatus*, popularmente conhecidos como lambaris do rabo amarelo e do rabo vermelho, respectivamente. Os animais foram coletados na bacia do Paraná-Paraguai. Os machos sexualmente maduros tiveram o aparelho reprodutor retirado, e todos os espécimes utilizados foram subsequentemente fixados em formol 4%, conservados em Álcool 70% e depositados no Museu do Departamento de Morfologia como espécimes-testemunho.

O aparelho reprodutor dos espécimes coletados foi retirado inteiro, fixado em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0,1M, pH 7.3, por pelo menos 12 horas, analisado quanto à presença e localização de regiões diferenciadas e estruturas anexas e documentados através de registros fotográficos digitais. Os testículos foram seccionados longitudinal e transversalmente, fixados em solução de Karnovsky e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0,1M, pH 7.3, por pelo menos 12 horas, incluídos em resina plástica, e seccionados com 3µm de espessura em micrótomo equipado com navalha de vidro. Para a análise da organização do compartimento germinativo, as secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina, Metanil Yellow + PAS (para detecção de proteínas e polissacarídeos neutros) e Azul de Toluidina (em diferentes pHs, para detecção de polissacarídeos ácidos) examinadas e documentadas através de registros fotográficos em estereomicroscopia e microscopia de luz.

CONCLUSÕES

A análise do material mostrou que, em *Astyanax sp* (Fig 1A, B), os testículos são órgãos pares, saculiformes, que se unem no ducto espermático, o qual desemboca na papila urogenital (Fig. 1C). Este é do tipo tubular anastomosado, com compartimento germinativo formado por alças e túbulos ramificados que se interconectam da periferia até o ducto testicular principal (Fig. 2A), característica que ocorre apenas nos osteichthyes basais, em que se incluem os teleósteos mais basais (GRIER, 1993; PARENTI & GRIER, 2004). No epitélio germinativo, a unidade morfofuncional da espermatogênese é o espermatocisto ou cisto (Fig. 2B, C), constituído por células germinativas, em desenvolvimento sincrônico, envoltas perifericamente pelas células de Sertoli (Fig. 2N). No interstício (Fig. 2º, P) encontram-se células de Leydig (Fig. 2º), mióides (Fig. 2P), tecido conjuntivo (Fig. 2P) e vasos sangüíneos (Fig. 2P). As células germinativas são divididas em espermatogônias (primárias e secundárias) (Fig. 2D-G), espermatócitos (primários e secundários) (Fig. 2H, I), espermatídes (Fig. 2J-L) e espermatozóides (Fig. 2M), conforme seu grau de desenvolvimento. As espermatogônias primárias (tipo A) (Fig. 2D) aparecem sozinhas no interior do cisto, possuem núcleo volumoso, cromatina descondensada e um nucléolo evidente. Elas dividem-se em espermatogônias secundárias (tipo B) (Fig. 2E), as quais possuem mais de um nucléolo e são encontradas em grupos de duas ou mais células dentro de um cisto (Fig. 2G). Estas células passam por sucessivas mitoses (Fig. 2F), tornam-se sucessivamente menores e enfim dão origem aos espermatócitos primários (I) (Fig. 2H, I), que não possuem nucléolo e apresentam complexos sinaptonêmicos no interior do núcleo. Os espermatócitos I, após a primeira divisão meiótica, transformam-se em espermatócitos secundários (II), os quais são dificilmente visualizados por entrarem rapidamente em meiose II. Estes diferem dos anteriores por possuírem um menor tamanho. Os espermatócitos II, então, originam as espermatídes (Fig. 2J-L). Estas possuem cromatina heterogeneamente condensada conforme sua maturação, perda progressiva de citoplasma e início do desenvolvimento do aparato flagelar. Ao término da maturação, as espermatídes são liberadas na luz dos túbulos, em um processo denominado espermição, e são então denominados espermatozóides (Fig. 2M). Eles possuem cromatina extremamente condensada, citoplasma muito reduzido e um único flagelo.

FIGURAS

Figura 1

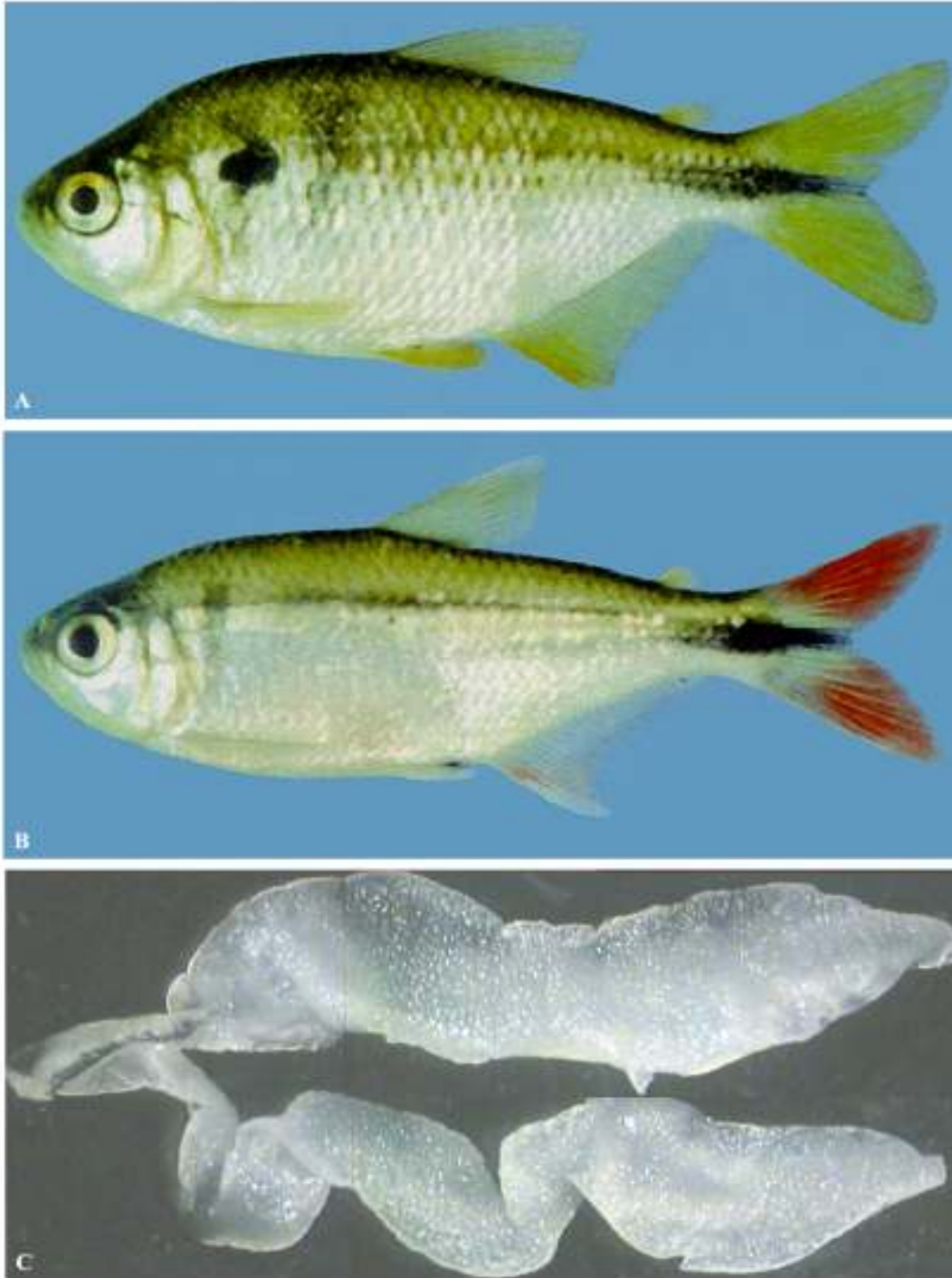
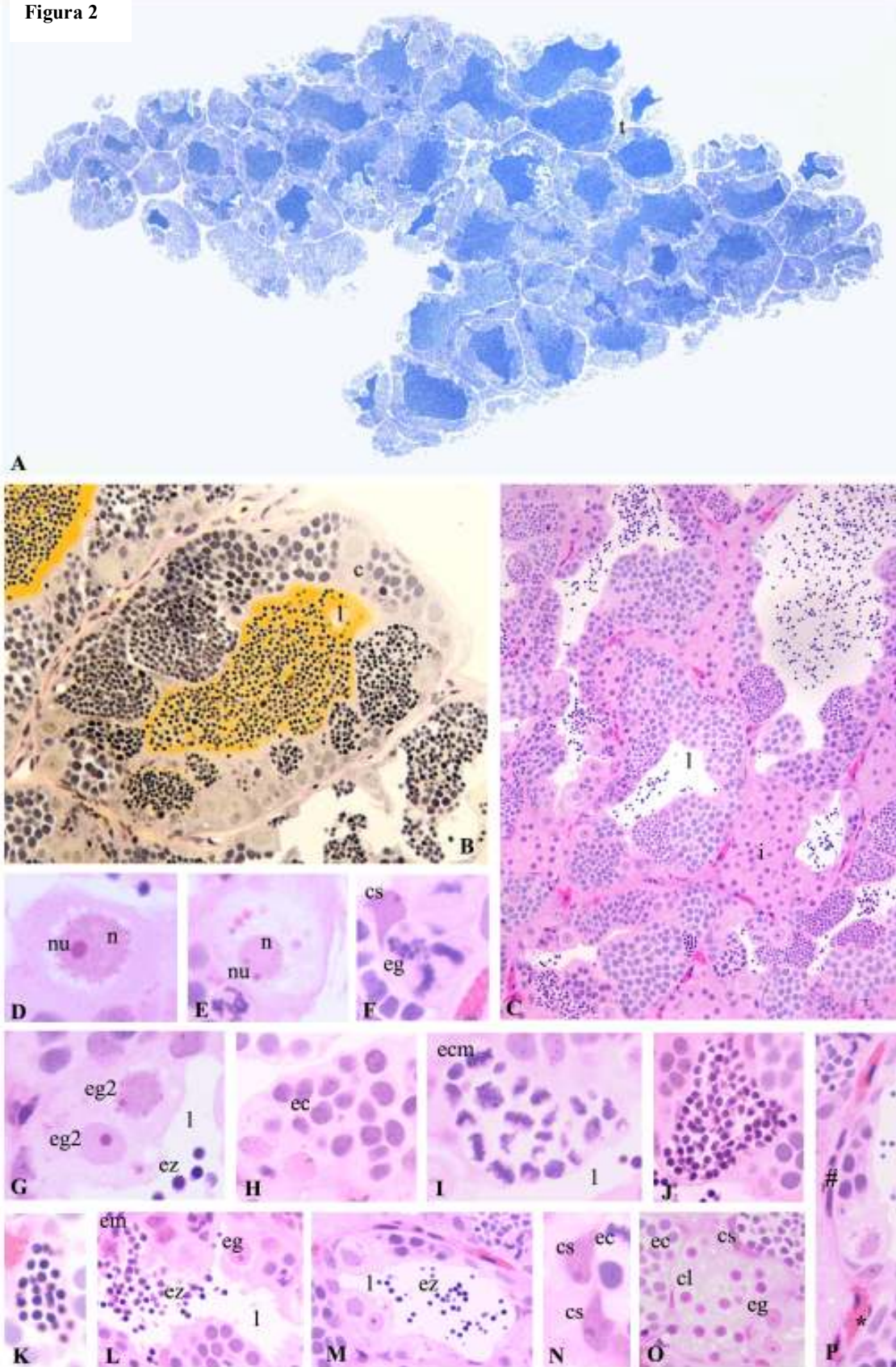


Figura 2



LEGENDA

Figura 1. A: Representante da espécie *Astyanax altiparanae*, utilizada no projeto – 2x; **B:** Representante da espécie *Astyanax fasciatus*, utilizada no projeto – 2x; **C:** Testículo de representantes do gênero *Astyanax* – 9x.

Figura 2. A: Estrutura testicular do testículo do gênero *Astyanax* (Azul de Toluidina) – 1,9x; **B, C:** Túbulo testicular composto por cistos, a unidade morfofuncional da espermatogênese (Metanil-Yellow + PAS, Hematoxilina-Eosina) – 7,3x e 8,4x; **D:** Espermatogônia do tipo A no interior de um cisto (Hematoxilina-Eosina) – 60x; **E:** Espermatogônia do tipo B no interior de um cisto, aparentemente sozinha devido ao plano de corte (Hematoxilina-Eosina) – 40x; **F:** Espermatônia do tipo B em divisão mitótica (Hematoxilina-Eosina) – 40x; **G:** Duas espermatogônias do tipo B no interior de um cisto (Hematoxilina-Eosina) – 40x; **H:** Espermatócitos primários em um cisto (Hematoxilina-Eosina) – 25x; **I:** Espermatócitos em metáfase meiótica no interior de um cisto (Hematoxilina-Eosina) – 32x; **J:** Espermátides em uma fase de desenvolvimento inicial em um cisto (Hematoxilina-Eosina) – 20x; **K:** Espermátides em uma fase de desenvolvimento final (Hematoxilina-Eosina) – 34x; **L:** Espermátides sendo liberadas na luz de um túbulo (Hematoxilina-Eosina) – 16x; **M:** Espermatozóides na luz do túbulo (Hematoxilina-Eosina) – 15x; **N:** Células de Sertoli ao redor de um cisto (Hematoxilina-Eosina) – 40x; **O:** Células de Leydig, repletas de vesículas lipídicas (Hematoxilina-Eosina) – 15x; **P:** Interstício, onde visualizam-se vasos sangüíneos (*) e células mióides (#) (Hematoxilina-Eosina) – 15x. Abreviações: c, cisto; cl: célula de Leydig; cs, célula de Sertoli; ec: espermatócito; ecm: espermatócito em metáfase; eg, espermatogônia primária; eg2, espermatônia secundária; em: espermátide; ez: espermatozóide; i, interstício; l, luz do túbulo; n, núcleo; nu, nucléolo; t – túbulo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à equipe do laboratório de técnicas citoquímicas do Departamento de Morfologia da UNESP, campus de Botucatu. O trabalho foi financiado através de uma bolsa de Iniciação Científica concedida pela FAPESP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURNS, J.R., et al. Sperm ultrastructure in characid fishes (Teleostei, Ostariophysii). In: MALABARBA, L. R., et.al (Eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998, p.235-244.

FINK, S.V. & FINK, W.L. Interrelationships of the ostariophysian fishes (Teleostei). **Zool. J. Linnaeus. Soc.**, London, n.72, p.297-353, 1981.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSEL, L.D. & GRISWOLD, M.D. (Eds). **The Sertoli cell**, Florida: Cache River Press, 1993. p.704-730.

HENNIG, W. **Phylogenetics systematics**. Urbana: University of Illinois Press, 1966.

NÓBREGA, R. H., QUAGIO-GRASSIOTTO, I., BORELLA, M.I., **Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus Spilopleura* (KNER, 1859) e *Pimelodus Maculatus* (LACÉPÈDE, 1803)**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PARENTI, L.R. & GRIER, H.J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integ. Comp. Biol.**, n.44, p.333-348, 2004.