

Características ultra-estruturais e diferenciativas das espermátides de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermiogênese

Ultrastructural features and differentiation of the spermatids in *Brycon orbignyanus* during the spermiogenesis

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Antonio Marcos Orsi
Departamento de Anatomia
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da UNESP
Distrito de Rubião Júnior
18618-000 – Botucatu – SP
e-mail: amorsi@ibb.unesp.br

1-Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade de Marília – SP
2-Departamento de Anatomia da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da UNESP, Botucatu – SP
3-Departamento de Morfologia e
Patologia da Universidade Federal de
São Carlos – SP

Eduardo Duarte AIRES¹; Máira Aparecida STEFANINI²; Antonio Marcos ORSI³

RESUMO

A espermiogênese que ocorre em piracanjuba *Brycon orbignyanus* pode ser dividida em quatro etapas morfológicas, cujas características principais consistem em reduções dos volumes citoplasmático, nuclear e celular, e compactação da cromatina nuclear das espermátides, sendo que as etapas espermiogênicas ocorrem simultaneamente. Ao final da espermiogênese, quando as espermátides atingem nível elevado de diferenciação, os núcleos se tornam mais compactos e os citoplasmas se tornam reduzidos. Estas modificações resultam na formação de células altamente diferenciadas, os espermatozóides com cabeça, peça intermediária e flagelo bem definidos. As espermátides e os espermatozóides foram observados em cistos germinativos, mas também podem ser encontrados na luz dos túbulos seminíferos.

UNITERMOS: *Brycon orbignyanus*; Ultra-estrutura; Espermátides.

INTRODUÇÃO

A espermiogênese foi estudada ao nível ultra-estrutural em diferentes espécies de peixes teleósteos, enfocando vários aspectos do desenvolvimento e diferenciação das espermátides que as conduzem à formação definitiva dos espermatozóides^{4,5,9,11,23,24}.

Nos teleósteos, o processo espermiogênético é parte da espermatogênese e ocorre, predominantemente, no interior de cistos germinativos, envolvidos por células de Sertoli, onde se localizam as espermátides que sofrem transformações sincrônicas. Estes cistos das espermátides compõem, junto com os cistos de outras células germinativas, os túbulos ou lóbulos seminíferos, que mostram uma histologia típica presente nos anamniotas^{10,12,18,22}.

À medida que a espermiogênese ocorre, os espermatozóides são formados e, posteriormente, são eliminados para a luz dos lóbulos ou são liberados em estágios anteriores de maturação, como espermátides jovens, nos padrões estruturais testiculares cístico e semicístico, respectivamente, descritos por Mattei *et al.*¹⁸.

Segundo Sprando; Russel²³, existem etapas diferenciadas do processo de espermiogênese, que ocorrem

em *Lepomis machrochirus*, um peixe de fecundação externa. Estas etapas conduzem à formação de espermatozóides e constam da fragmentação do envelope nuclear, seguida de rearranjo do núcleo, redução do volume nuclear, condensação da cromatina, diminuição do volume citoplasmático, formação da fossa de implantação do flagelo e presença de corpos residuais. Os espermatozóides formados e liberados apresentam volumes citoplasmáticos e nucleares reduzidos, quando comparados com as espermátides que lhes deram origem.

Em tilápia (*Oreochromis niloticus*), foram relatadas sete etapas do processo espermiogênético. Dentre elas, se destacam as fases inicial, intermediária e final de condensação da cromatina, até a formação dos espermatozóides¹⁷.

Devido à importância do processo espermiogênético na reprodução dos teleósteos, principalmente aqueles que fazem fecundação externa, o objetivo do presente estudo foi evidenciar as etapas desse processo que ocorre nos testículos do peixe neotropical piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) em época reprodutiva, ou seja, durante a primavera, caracterizando detalhes ultra-estruturais da formação dos seus espermatozóides.

MATERIAL E MÉTODO

Os estudos ultra-estruturais das espermatídes e de outras células germinativas testiculares inter-relacionadas foram realizados em microscopia eletrônica de transmissão, a partir de fragmentos dos testículos de 8 piracanjubas (*Brycon orbignyanus*) adultos e sexualmente maduros. Os tecidos testiculares foram fixados em solução de Karnovsky¹⁵ durante 3 horas. A seguir, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, lavado em tampão, desidratado em seqüência crescente de acetona e incluído em Araldite (Durcupan ACM, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), sendo a polimerização da resina completada durante 48 horas em estufa a 60°C.

Após a inclusão dos tecidos, foram feitas secções de 0,5 mm de espessura em ultramicrotomo (Ultramicrotome Huxley; Cambridge, Inglaterra) e coloração com Azur II e Azul de Metileno para seleção de campos adequados nos estudos preliminares em microscopia óptica, visando posterior análise ultra-estrutural em cortes de 80 nm de espessura.

Os cortes ultrafinos foram transpostos para telas de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. A análise e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 301 (Eindhoven, Holanda) no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

RESULTADOS

Nos túbulos seminíferos dos testículos de piracanjuba, em fase reprodutiva, observam-se dentro dos cistos germinativos diferentes tipos celulares, inclusive as espermatídes e espermatozóides. A espermiogênese, no contexto da espermatogênese, é um processo cíclico que resulta na formação dos espermatozóides. Etapas morfológicas deste processo puderam ser observadas na piracanjuba (Fig. 1 a 8).

As espermatídes jovens possuem formato arredondado, núcleo centralizado com cromatina pouco condensada e finamente granular (Fig. 1). A espermiogênese tem início com o deslocamento da cromatina das espermatídes para um dos pólos do núcleo celular, ao mesmo tempo em que se observa um aumento no grau de compactação da cromatina. A microscopia eletrônica revelou maior eletrodensidade nuclear já nesta fase (Fig. 2).

Seqüencialmente, ocorre uma única quebra de membrana nuclear, que se inicia no pólo oposto ao de condensação da cromatina (Fig. 3). Após aquela, os fragmentos de membrana nuclear se reúnem para reconstituí-la. Ocorre também a formação de corpos residuais que saem do núcleo e se dirigem ao citoplasma, atingindo a luz do cisto (Fig. 4). Os

corpos residuais contêm porções do nucleoplasma e restos de endomembranas e podem estar localizados tanto na luz dos cistos quanto no interior das células císticas (Fig. 5).

No último estágio de diferenciação das espermatídes, a cromatina nuclear apresenta-se grosseiramente condensada por todo o núcleo, e no local da fossa de implantação do flagelo no citoplasma observa-se a porção inicial do flagelo (Fig. 6).

As espermatídes sofrem, ao longo da espermiogênese, grandes modificações ultra-estruturais que consistem, principalmente, na redução dos volumes citoplasmático e nuclear e na compactação da cromatina nuclear. Ao final da espermiogênese, quando as espermatídes alcançam elevado grau de diferenciação, o núcleo está reduzido, resultando na formação final dos espermatozóides (Fig. 7).

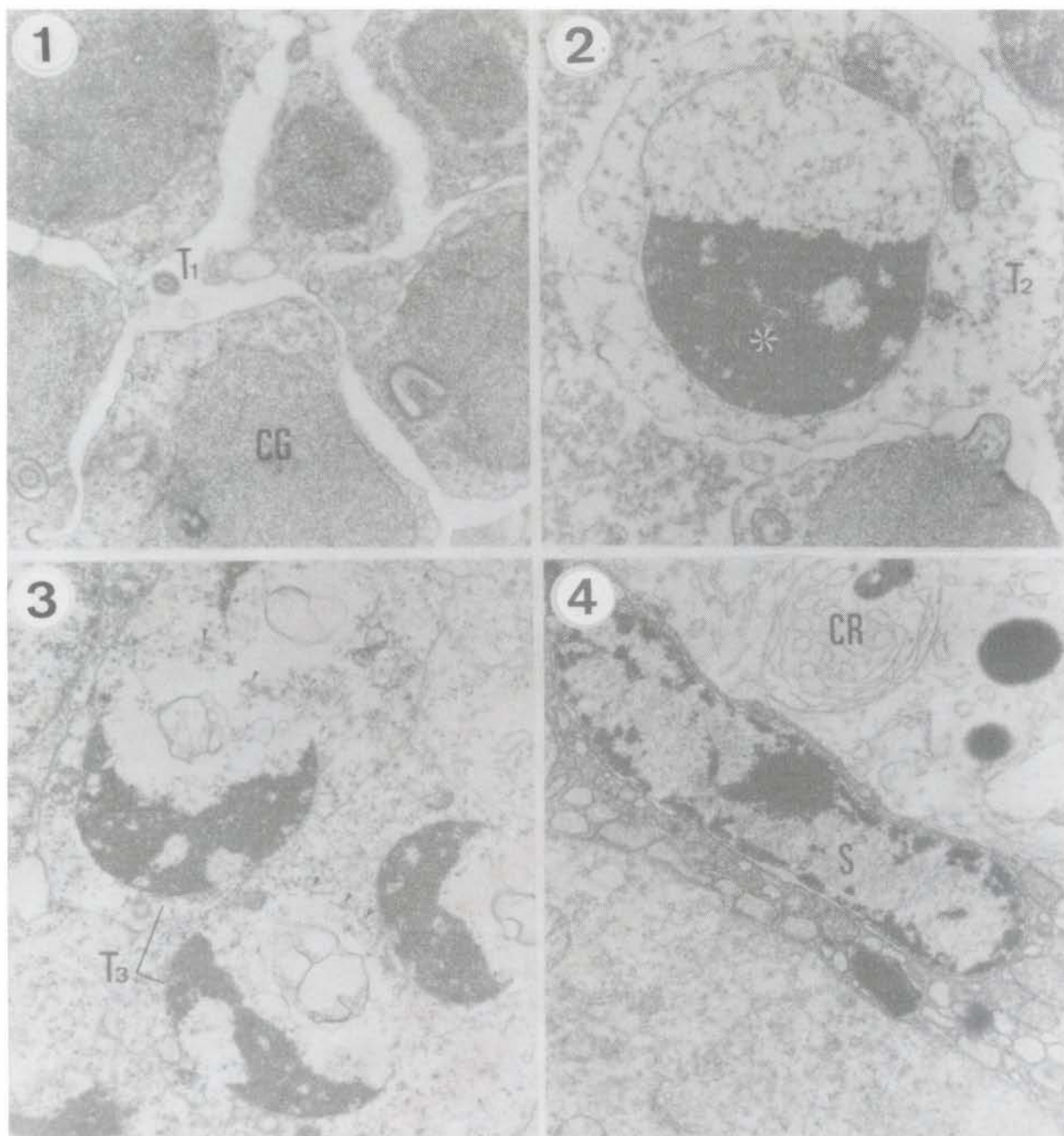
Os espermatozóides recém-formados são encontrados dentro dos cistos (Fig. 7) e livres na luz dos túbulos seminíferos (Fig. 8), uma vez que quando a parede dos cistos dos espermatozóides é rompida tem-se a espermição. Os espermatozóides mostram três partes distintas: cabeça, peça intermediária e cauda, não apresentando acrossoma (Fig. 8).

DISCUSSÃO

Na estruturação histológica dos testículos de teleósteos, inclusive no piracanjuba, verifica-se, geralmente, uma organização tubular seminífera cística. Equivale a dizer que, em vez de existir um sistema tubular padronizado e revestido por epitélio seminífero contínuo e constante, como se observa em mamíferos^{6,7}, nos testículos de peixes as células germinativas geralmente se dividem e se diferenciam no interior de cistos germinativos ou de espermatocistos, sendo este processo cístico observado e descrito por diferentes autores^{2,4,12,20,25}.

Dentre as etapas morfológicas diferenciativas que compõem a espermiogênese em teleósteos, destacam-se a migração centriolar, a formação do flagelo, a rotação e condensação nucleares, a migração das mitocôndrias e a eliminação do excesso de citoplasma, como já fora descrito em alguns outros teleósteos, como *Lebistes reticulatus*¹³, *Poecilia reticulata*³, *Oryzias latipes*⁹ e *Fundulus heteroclitus*²¹.

O processo espermiogênético que ocorre no piracanjuba pode-se resumir em 4 etapas de diferenciação das espermatídes. A primeira etapa (T1) representa o início tanto da condensação da cromatina quanto do início da formação do flagelo. A segunda (T2) implica a migração da cromatina para um dos pólos nucleares. Na terceira etapa (T3), ocorre o rompimento da membrana nuclear que será reconstituída na quarta e última etapa do processo (T4), onde o núcleo se apresenta muito condensado e de tamanho



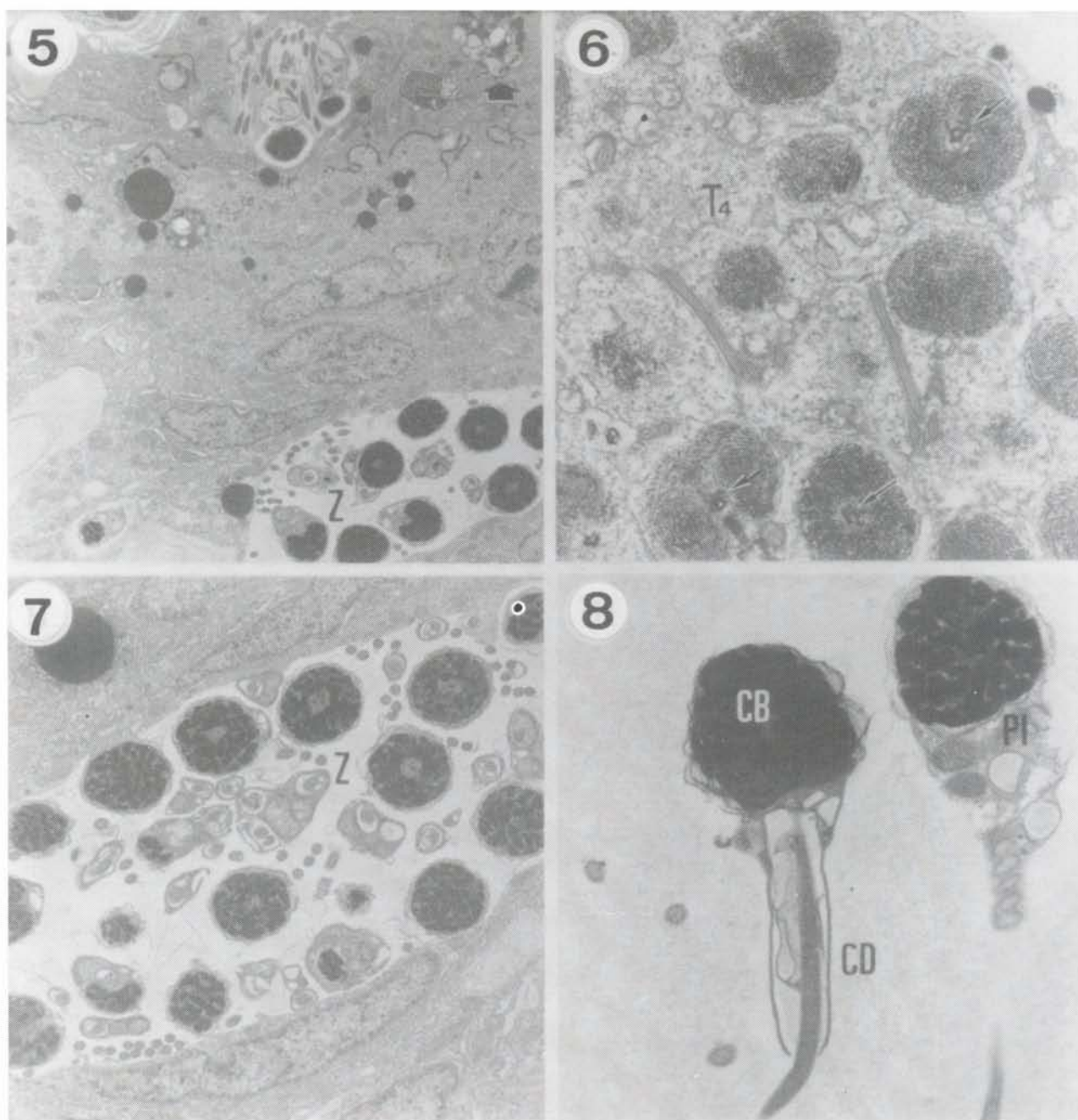
Figuras 1 a 4

Etapas 1 a 3 (T1 a T3) do processo espermiogênético em cistos dos túbulos seminíferos de piracanjuba: cromatina granular (CG) em T1 (Fig. 1), condensação parcial e polarizada da cromatina (*) em T2 (Fig. 2), cromatina ainda parcialmente condensada, quebra de membrana nuclear no pólo oposto com fragmentos de membrana (cabeça de seta) em T3 (Fig. 3), e corpo residual (CR), na luz de um cisto espermatogênético, delimitado por uma célula de Sertoli (S) em T3 (Fig. 4). Aumentos de 21.000X (Fig. 1 e 2); 13.000X (Fig. 3) e 16.500X (Fig. 4).

reduzido. Há formação de corpos residuais que sofrerão processo de degeneração efetuado pelas células de Sertoli. As observações sobre as etapas da espermiogênese encontradas no piracanjuba estão de acordo com observações anteriores de Grier⁹, Silva²² e Sprando; Russel²³. Esses autores descreveram

o processo espermiogênético respectivamente para *Oryzias latipes*⁹, *Oreochromis niloticus*²² e *Lepomis machrochirus*²³.

A parede dos cistos espermatogênicos tende a se romper quando as células germinativas se encontram no estágio final de maturação. Assim sendo, é observada ruptura dos



Figuras 5 a 8

Etapa final do processo espermiogênético (T4): corpo residual (ç) no interior do citoplasma de uma célula cística (Fig.5), fossa de implantação do flagelo (?) em espermátides encistadas (Fig.6), espermatozóides (Z) estocados na luz de cistos (Fig.5 e 7), espermatozóides livres na luz tubular seminífera com cabeça (CB), peça intermediária (PI) e cauda (CD) (Fig.8).Aumentos de 6.500X (Fig.5), 13.000X (Fig.6 e 7) e 21.000X (Fig.8).

espermatozoides que são liberados para a luz dos túbulos. Por outro lado, diferenciações celulares, reorganizações do núcleo, dos volumes nuclear e citoplasmático e do padrão de cromatina, e caracterização do flagelo e corpos residuais foram observadas ultra-estruturalmente nos cistos

de espermátides, também, no piracanjuba. Os corpos residuais, após exteriorização, são fagocitados pelas células de Sertoli passando por processo degenerativo, de acordo com o que foi estudado por Sprando; Russel²³ e observado na espermiogênese do piracanjuba.

Nas fases finais de maturação, os túbulos seminíferos apresentam-se repletos de espermatozóides e somente alguns poucos cistos permanecem com seus conteúdos celulares, no piracanjuba e no matrinxã, sendo este estudado por Zaniboni-Filho; Kawakami de Resende²⁵.

Ao final da espermiogênese, os espermatozóides do piracanjuba mostram cabeça, peça intermediária e flagelo bem definidos. Na região da cabeça não foi observado o acrossoma, como já havia sido descrito por vários autores, em espermatozóides de outros teleósteos^{8,14,16,17,19}. A ausência de

acrossoma é característica da maioria dos teleósteos que apresentam fecundação externa^{1,22}.

AGRADECIMENTOS

Às Senhoras Maria Helena Moreno e Maria Euleda Lino Perez, do Centro de Microscopia Eletrônica do IB/B-UNESP, pelo auxílio prestado na parte técnica, e ao Centro de Treinamento e Pesquisa em Aquicultura (CEPTA), pela concessão dos peixes.

SUMMARY

Spermiogenesis in *Brycon orbignyus* may be divided in four stages, which consist mainly in reduction of cytoplasmic, nuclear and cellular volumes and compactation of the nuclear chromatin, whose stages of the process occur simultaneously. At the end of the spermiogenesis, when the spermatids reach high levels of differentiation, the nuclei become more compact and cytoplasm become reduced. These modifications result in the formation of new highly differentiated cells, the spermatozoa. Spermatozoa may be observed predominantly in cysts, like spermatids, or inside the lumen of the seminiferous tubules. Ultrastructurally, three different parts have been clearly identified in *Brycon orbignyus* spermatozoon: head, middle-piece and flagellum.

UNITERMS: *Brycon orbignyus*; Ultrastructure; Spermatids.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-AFZELIUS, B.A. Fine structure of the garfish spermatozoon. **J. Ultrastruct. Res.**, v.64, n.3, p.309-14, 1978.
- 2- ALEXANDRINO, A.C.; PHAN, M.T.; PINHEIRO, E.F.G. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. **Bol. Zool. Univ. S. Paulo**, v.9, p.159-75, 1985.
- 3- BILLARD, R. La spermatogénese de *Poecilia reticulata*. III. Ultrastructure des cellules de Sertoli. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v.10, n.1, p.37-50, 1970.
- 4- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.26, n.4, p.877-920, 1986.
- 5- BRUSLE, S. Ultrastructure of spermiogenesis in *Liza aurata* Rizzo, 1810 (Teleostei, Mugilidae). **Cell Tissue Res.**, v.217, p.415-24, 1981.
- 6- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiol. Rev.**, v.52, n.1, p.198-236, 1972.
- 7- CLERMONT, Y. Four decades of research on the biology of the male reproductive system: A few landmarks. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.637, p.17-25, 1991.
- 8- GARDINER, D.M. Fine structure of the spermatozoon of the viviparous teleost, *Cymatogaster aggregata*. **J. Fish Biol.**, v.13, p.435-8, 1978.
- 9- GRIER, H.J. Sperm development in the teleost *Oryzias latipes*. **Cell Tissue Res.**, v.168, n.4, p.419-32, 1976.
- 10- GRIER, H.J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **Am. Zool.**, v.21, n.2, p.345-57, 1981.
- 11- GRIER, H.J.; FITZSIMONS, J.M.; LINTON, J.R. Structure and ultrastructure of testis and sperm formation in Goodeid teleosts. **J. Morphol.**, v.156, n.3, p.419-37, 1978.
- 12- 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.**, v.159, n.3, p.331-45, 1980.
- 13- GRONBERG, R.; TELKKA, A. Juxtannuclear changes during the early spermatogenesis in *Lebistes reticulatus* (Guppy). **Z. Zellforsch.**, v.84, n.3, p.342-9, 1968.
- 14- GWO, J.C.; GWO, H.H.; CHANG, S.L. Ultrastructure of the spermatozoon of the teleost fish *Acanthopagrus schlegelii* (Perciformes: Sparidae). **J. Morphol.**, v.216, n.1, p.29-33, 1993.
- 15- KARNOVSKY, M.I. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v.27, p.137-8A, 1965.
- 16- LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A.; WEISSMANN, T. Testicular main ducts and spermatic ducts in some cyprinid fishes. I. Morphology, fine structure and histochemistry. **J. Fish Biol.**, v.44, p.937-51, 1994.
- 17- LOU, Y.H.; TAKAHASHI, H. Spermiogenesis in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, with notes on a unique pattern of nuclear chromatin condensation. **J. Morphol.**, v.200, p.321-30, 1989.
- 18- 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.**, v.43, n.6, p.931-7, 1993.
- 19- OHTA, T.; MIZUNO, T.; MIZUTANI, M.; MATSUDA, M. Sperm morphology and IMP distribution in membranes of spermatozoa of cyprinid fishes I.J. **Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.26, n.2, p.181-9, 1994.
- 20- PORAWSKI, M.; WASSERMANN, G.F.; ACHAVAL, M. Morphology of the seminiferous tubules in Kingfish (Odonthestes). **Rev. Brasil. Biol.**, v.57, n.1, p.151-9, 1997.
- 21- SELMAN, K.; WALLACE, R.A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **Amer. Zool.**, v.26, p.173-92, 1986.

AIRES, E.D.; STEFANINI, M.A.; ORSI, A.M. Características ultraestruturais e diferenciativas das espermatídes de piracanjuba (*Brycon orbignyus*) durante a espermiogênese. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 183-188, 2000.

- 22- SILVA, M. **Morfologia ultra-estrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hematotesticular da tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Peixe, Ciclídeo)**. Minas Gerais, 1987. 164p. Tese (Doutoramento)– Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- 23- SPRANDO, R.L.; HEIDINGER, R.C.; RUSSELL, L.D. Spermogenesis in the bluegill (*Lepomis macrochirus*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. **J. Morphol.**, v.198, n.2, p.165-77, 1988.
- 24- STANLEY, H.P.; LAMBERT, C.C. The role of a Sertoli cell actin-myosin system in sperm bundle formation in the ratfish, *Hydrolagus collieri* (Chondrichthyes, Holocephali). **J. Morphol.**, v.186, n.2, p.223-36, 1985.
- 25- ZANIBONI FILHO, E.; KAWAKAMI DE RESENDE, E. Anatomia de gônadas, escala de maturação e tipo de desova do matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Teleostei: Characidae). **Rev. Brasil. Biol.**, v.48, n.4, p.833-44, 1988.

Recebido para publicação: 25/01/1999

Aprovado para publicação: 19/10/1999