

**MARIANA GOMES DO RÊGO**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS OVÁRIOS E  
TESTÍCULOS DE TUBARÕES OCEÂNICOS  
CAPTURADOS NO ATLÂNTICO SUL E  
EQUATORIAL**

**RECIFE,**

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**MARIANA GOMES DO RÊGO**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS OVÁRIOS E  
TESTÍCULOS DE TUBARÕES OCEÂNICOS  
CAPTURADOS NO ATLÂNTICO SUL E  
EQUATORIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Hissa Vieira Hazin

**RECIFE  
2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS OVÁRIOS E TESTÍCULOS DE TUBARÕES  
OCEÂNICOS CAPTURADOS NO ATLÂNTICO SUL E EQUATORIAL**

Dissertação de Mestrado elaborada por

**MARIANA GOMES DO RÊGO**

E aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. JOAQUIM EVÊNCIO NETO - Presidente  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dra. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO  
Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE

Prof. Dr. FÁBIO HISSA VIEIRA HAZIN  
Departamento de Pesca e Aqüicultura - UFRPE

Prof. Dr. PAULO GUILHERME V. DE OLIVEIRA  
Departamento de Pesca e Aqüicultura - UFRPE

*Dedico a minha mãe, por tudo que ela representa. Te Amo.*

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar a Deus, por ter me colocado nesta família maravilhosa. Ao meu irmão, que me deu o sobrinho mais lindo (Titico), ao meu Pai (meu 3 em 1), minha madrinha, meus tios e primos, as minhas avós (Marina e Teca) que continuam olhando por mim lá do céu.

A minha pequena, ANALU, que trouxe brilho e alegria para nossa família, nosso amor maior !!! E também à melhor mãe do mundo, a quem não me canso de agradecer, sem você, mãe eu não sou nada. Te amoooooo.

Ao meu Orientador, Joaquim Evêncio Neto, que me aceitou de todas as formas desastradas, sempre brigando e batalhando juntos. Obrigada por tudo Professor, serei eternamente grata.

Ao Prof. Dr. Fabio Hazin, ou seja, Tio Fabinho, que sempre foi um amigo e um pai. Muito obrigada pela oportunidade de crescer junto com você.

Ao meu amigo, companheiro, cúmplice, nem sei mais o que, também Prof. Dr. Paulo Oliveira, MEU GALEGO, obrigada por tudo sempre, não só por ter me acolhido no aquário, mas por esta todos estes anos comigo me apoiando e me ensinando. Te amo muitoooo, Lorinho.

As minhas amigas Taty (irmã gêmea ativar), Pat (cabeção), Quel, Lecca e Dani, que sempre tiveram comigo nos momentos mais felizes e difíceis, posso dizer SOMOS IRMÃS!!!!

A minha Co- louca amiga GO, que caiu na minha vida como um anjo, e junto me levou para esse caminho da Histologia e devo a ela tudo que sei (o pouco). Amiga valeu por tudo.

As minhas pequenas Naty e Polly, meus braços, pernas e algo mais, Obrigada e desculpa as loucuras....Amo!

A Maga, Edna, Raquel, Simone e Aninha, que sempre estavam prontas para mais uma rotina de blocos e lâminas, e mais papos cabeças...haha. Obrigada, meninas....

Aos amigos do LOP/ LEP/ LEMAR, muito obrigada!!! E aos Baianos (Diogo, Natan, Atila, Eudes, Hudson e Caio) sempre prontos a ajudar...".Valeu meu Rei!"

Aos amigos do Mestrado e Doutorado da Biociência Animal, pela paciência e boas risadas nas aulas.

A Xilipe, Brunão, Ju, Ligia, Antonio Pedro, Luiz e Sandra.....um obrigada sempre....; vocês moram no meu coração.

Ao amigo Pandolino, que em muitos momentos foi um céu todo...valeu o Help, Brother! E à galera do DIMAR.

Aos Professores Do Programa de Biociência Animal, Professor Dr. Junior, Professora Dra. Ana Porto e Professora Dra. Tatiana Porto, pelos ensinamentos.

Às minhas amadas, sempre, longe ou perto, sempre serão AmadaS (Mel, Polly, Flor, Ju, Danna, Bitá, Fri e Pudim)...eternamente amooooooooooooooooooooo.....

À família Oliveira (Tia Dudu, Tio Galego, Paty, Nico, Dani e João Victor) e minha amiga Linha.

A minhas amigas Ana Rita, Chuchu, Grazi e as meninas da Ictiologia.

Aos meus amigos de Toronto (Zé, Ceres, Muriçoca, Ale, Paula, Tita, Catha, Lila, Cacá e Suh); valeu a força no gelo. Saudades.

À minha roça, VINI, que foi a enzima catalisadora desta reação, sem ele não teria sido tão rápido. Te amo, saudades sempre!

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a morfologia dos ovários e testículos de tubarões oceânicos capturados no Atlântico sul e Equatorial. Para tanto as amostras foram coletadas, entre janeiro de 2008 e março de 2010, através das embarcações da frota atuneira, capturadas ao longo do Atlântico Sul e Equatorial, onde foram coletadas 17 fêmeas e 164 machos. Nas embarcações foi retirado o trato visceral dos animais. Após a triagem, os ovários e testículos foram pesados e medidos (comprimento e largura), sendo identificados macroscopicamente o seu estado maturacional. Para a realização da análise histológica do material, os ovários foram fixados em formol a 10% com água do mar, por 48 horas e os testículos em fixador de Bouin também por 48 horas. Em seguida passaram pelo protocolo histológico. Na análise macroscópica dos ovários foram encontrados três estágios maturacionais distintos: estágio I (Imaturo), estágio II (em maturação) e estágio III (Maduro). No estágio I foram classificados 3 ovários imaturos, no estágio II 5 ovários em maturação e no estágio III 9 ovários maduros. Nas fêmeas imaturas foram encontrados ovários pequenos com largura entre 1,0 e 3,1 cm, com estrutura interna gelatinosa ou granular, nas fêmeas em maturação, os ovários se encontravam um pouco maiores apresentando largura variando de 5,2 e 6,0 cm e nos ovários maduros possuía largura variando entre 6,5 e 7,8 cm, apresentando um formato arredondado, com ovócitos grandes e bem desenvolvidos. Na análise microscópica foi observado que os ovários são revestidos por tecido epitelial simples plano, nos primeiros estágios de desenvolvimento, variando para simples cúbico nos estágios finais da maturação. Logo abaixo do epitélio se encontra a albugínea composta por tecido conjuntivo denso e regiões de fibras musculares. No estágio inicial de maturação os ovários apresentam o órgão epigonal, não diferenciando-se histologicamente do ovário. Já

nos ovários maduros foi evidenciado o epitélio simples cúbico, logo abaixo do epitélio encontra-se uma camada de tecido conjuntivo denso e uma camada muscular com presença de ovócitos vitelogênicos e células adiposas. Evidenciou-se também uma fina membrana vitelínica delimitando os ovócitos. Foi observada a zona pelúcida separando os ovócitos da parede do folículo e uma lâmina basal entre as camadas granulosa e a camada da teca. Para os testículos, dos 164 indivíduos coletados, 52 foram *Isurus oxyrinchus*, 17 *Carcharhinus falciformis* e 95 *Carcharhinus longimanus*. Para as três espécies estudadas foi observada que a variação nos três estágios maturacionais proposto não tiveram alteração morfológica visível. Para a caracterização microscópica, o desenvolvimento celular nos três estágios maturacionais, também se apresentou o mesmo para as três espécies estudadas. No estágio I caracterizou-se pela presença do órgão epigonal que nessa fase é indiferenciado do testículo, apresentando assim a mesma constituição histológica. No estágio II há uma diminuição do órgão epigonal e a diferenciação do testículo com o surgimento das primeiras células germinativas (espermatogônias). No estágio III o órgão epigonal se apresenta apenas como uma fina camada revestindo o testículo, este encontra-se bastante desenvolvido com presença de túbulos seminíferos grandes e com grande quantidade de espermatozoides. Já na classificação da disposição morfológica dos testículos ocorreu diferença, uma vez que, na espécie *Isurus*, evidenciou-se Radial e para os *Carcharhinus* foi denominada como diamétrica.

**Palavras – chave:** Elasmobrânquios; Reprodução; Gônadas

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the ovaries morphology and testes from oceanic sharks caught in the South Atlantic and Equatorial. For both samples were collected between January 2008 and March 2010, through the tuna fleet the vessels, captured along the South and Equatorial Atlantic, where they were collected 17 females and 164 males. In the vessels was removed visceral animals tract. After screening, the ovaries and testes were weighed and measured (length and width), identified macroscopically their maturational state. To perform the histological analysis of the material, the ovaries were fixed in 10% formalin sea water for 48 hours and testes in Bouin's fixative for 48 hours too. Then they were passed through the protocol histology. The microscopic analysis of ovaries was found three distinct maturational stages: Stage I (Immature), stage II (maturing) and stage III (mature). The first stage was classified immature ovaries; the second one was in five ovarian maturation and the third was nine ovarian mature. Immature females were found in ovaries with small width between 1.0 and 3.1 centimeters, with internal gelatinous structure or granules in maturing females, the ovaries were slightly higher showing varying width of 5.2 and 6.0 centimeters and mature ovaries had a width varying between 6.5 and 7.8 centimeters, with a rounded shape with large and well developed oocytes. On microscopic examination was observed that the ovaries are covered by epithelial tissue simple plan in the early stages of development, ranging for simple cubic in the final stages of maturation. Below the epithelium is the albuginea composed of dense connective tissue and regions of muscle fibers. In the initial stage of maturation, the ovaries presented epigone organ, they were not different histologically of the ovary. Now in the mature ovaries was shown a simple cubic epithelium, below the epithelium is a layer of dense connective tissue and muscle layer with the presence

of vitellogenic oocytes and fat cells. It also showed a thin membrane enclosing the yolk oocytes. It was observed separating the pellucida zone of the oocyte from the follicle wall and a basal lamina between layers and granular teak layer. For the testes, of the 164 individuals collected, 52 were *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus falciformis* 17 and 95 *Carcharhinus longimanus*. For the three species it was observed that the variation in the three maturation stages proposed had no visible morphological change. To characterize microscopic, cellular development in the three maturation stages, it also showed the same for all three species. The first stage was characterized by the presence of organ epigone that this phase is undifferentiated testis, thus presenting the same histological composition. The second stage there is a decrease in body epigone and differentiation of the testis with the emergence of the first germ cells (spermatogonia). The third stage the national epigone only present as a thin layer lining the testis, this is well developed and large seminiferous and the tubules with large amounts of sperm. In the classification of morphological testis there was a difference, once the species *Isurus* there was and Radial, for *Carcharhinus* was named as diametric.

**Keywords:** Elasmobranchs; Reproduction; Gonads

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	X
<b>ABSTRACT</b>	Xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	Xii
<b>LISTA DE TABELA</b>	Xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	02
2.1. Descrição das espécies	02
2.1.1. <i>Carcharhinus falciformis</i>	02
2.1.2. <i>Carcharhinus longimanus</i>	03
2.1.3. <i>Isurus oxyrinchus</i>	03
2.2. Estratégias reprodutivas	04
2.3. O Aparelho reprodutor feminino	05
2.4. O Aparelho reprodutor masculino	08
<b>3. OBJETIVOS</b>	14
3.1. OBJETIVO GERAL	14
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
<b>4. REFERÊNCIAS</b>	15
1º artigo- Análise morfológica do ovário do tubarão lombo preto, <i>Carcharhinus falciformis</i> (Muller & Henle, 1839) capturados no Atlântico Sul e Equatorial	19
Resumo	19
1. Introdução	20
2. Material e métodos	22
3. Resultados	23
4. Discussão	24
5. Conclusão	26
6. Agradecimento	27
7. Referências	27
2º artigo- Análise morfológica dos testículos de tubarões oceânicos capturados no Atlântico Sul e Equatorial	32
Resumo	32
1. Introdução	33
2. Material e métodos	34
3. Resultados	35
4. Discussão	38
5. Conclusão	40
6. Agradecimento	40
7. Referências	40
<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Foto do tubarão <i>Carcharhinus falciformis</i>	03
Fig. 2. Foto do tubarão <i>Carcharhinus longimanus</i>	03
Fig. 3. Foto do tubarão <i>Isurus oxyrinchus</i>	04
<b>ARTIGO 1°</b>	
Fig. 1. Foto do ovário do Tubarão <i>Carcharhinus falciformis</i> , evidenciando órgão epigonal (seta preta) e com ovócitos indiferenciados (seta amarela)	29
Fig. 2. Foto do ovário maduro do tubarão <i>Carcharhinus falciformis</i> , evidenciando ovócitos em diferentes diâmetros (setas).	29
Fig. 3. Foto micrografia das lamínas de ovários de tubarão <i>Carcharhinus falciformis</i>	31
<b>ARTIGO 2°</b>	
Fig. 1. Foto do testículo imaturo do tubarão <i>Carcharhinus longimanus</i>	43
Fig. 2. Foto do testículo maduro do tubarão <i>Carcharhinus longimanus</i>	43
Fig. 3. Foto micrografia dos testículos de tubarão <i>Isurus oxyrinchus</i>	44
Fig. 4. Foto micrografia dos testículos de tubarão <i>Carcharhinus longimanus</i> e <i>Carcharhinus falciformis</i>	45

## LISTA DE TABELA

Tabela 1. Relação entre o estagio maturcional do  
*Carcharhinus falciformis*, comprimento do animal e peso do ovário

30

## 1. INTRODUÇÃO

Tubarões, raias e quimeras são peixes de esqueleto cartilaginoso, incluídos num mesmo grupo denominado Chondrichthyes (LAST, 1994), formada por 51 famílias, 168 gêneros e cerca de 1.100 espécies conhecidas. Destes, os tubarões representam 30 famílias, 101 gêneros e cerca de 400 espécies; as raias correspondem a 18 famílias, 61 gêneros e entre 494 e 571 espécies e as quimeras 3 famílias, 6 gêneros e de 31 a 50 espécies (COMPAGNO, 1990).

Das cerca de, 400 espécies conhecidas de tubarões, 5% são oceânicas, podendo realizar grandes migrações (CORTEZ, 2000). Como são animais predominantemente predadores, estando no topo da cadeia trófica marinha, ocorrem em números relativamente menores do que a maioria dos peixes teleósteos. Informações sobre a história de vida e dinâmica populacional estão disponíveis, sobretudo, para as espécies com interesse pesqueiro. Entretanto, a importância ecológica, como o papel dos tubarões e raias em comunidades complexas, só recentemente foi reconhecido em decorrência das alterações geradas pela pesca intensiva (HOENING e GRUBER, 1990).

Em geral, o tamanho das populações são resultado da taxa de fecundidade, taxa de recrutamento (imigração e emigração) e mortalidade. Os Chondrichthyes são caracterizados por crescimento lento, maturidade tardia, baixas taxas de fecundidade e produtividade, alta sobrevivência natural (para todas as faixas etárias) e alta longevidade (HOLDEN, 1975). Esse conjunto de características resulta em baixo potencial reprodutivo para a maioria das espécies, com sérias implicações para a sustentabilidade pesqueira, o que confere às populações de elasmobrânquios uma capacidade limitada de recuperação em caso de sobre-exploração (IUCN, 1996).

Todas as espécies de tubarões possuem reprodução sexuada com fertilização interna. Algumas espécies são vivíparas, seus embriões permanecem no útero durante todo o período de desenvolvimento, de forma que já nascem totalmente desenvolvidos, sendo, assim, miniaturas dos adultos. A classe vivípara pode ser dividida em placentária e aplacentária a depender da relação entre o desenvolvimento da mãe com os descendentes (BUDKER, 1958).

Entre as 30 famílias de tubarões, inclui a Carcharhinidae formada por espécies (e.g. *Carcharhinus longimanus* e *C. falciformis*) que possuem reprodução vivípara placentária (KOOB e CALLARD, 1991). A família Carcharhinidae constitui cerca de 40 a 50% das capturas obtidas com espinhel pelágico no Atlântico Sul e Equatorial (HAZIN *et al.*, 1994). Um exemplo da reprodução aplacentária pode ser encontrada na família Lamnidae, como o caso do tubarão *Isurus oxyrinchus*, cuja reprodução é caracterizada como ovofagia, neste caso, os embriões são nutridos pela gema contida no saco vitelínico, sendo depois incubados no útero da fêmea, sem ligação placentária, onde possivelmente ocorre o canibalismo intra-uterino (embriões mais desenvolvidos comem os ovócitos não fertilizados ou menos desenvolvidos) (COMPAGNO, 1990; GILMORE, 1993).

Ainda hoje o conhecimento sobre a biologia reprodutiva dos tubarões é pouco estudada, com isso, é importante conhecer mais a cerca da reprodução, buscando um detalhamento maior da morfologia dos aparelhos reprodutivos, para auxiliar num futuro próximo, subsídios para preservar e conservar esses animais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Descrição das espécies**

#### **2.1.1. *Carcharhinus falciformis***

Os tubarões lombo-preto, *Carcharhinus falciformis*, possuem comprimento total de 330 cm, são vivíparos placentários, com um período de gestação de aproximadamente 12 meses e um tamanho de nascimento, estimado para a espécie, em torno de 70-87 cm de comprimento total (COMPAGNO, 1984).



Fig. 1. Tubarão *Carcharhinus falciformis*. Fonte: Fishbase, by Torres Rojas, Y.

### 2.1.2. *Carcharhinus longimanus*

Os tubarões galha branca oceânico, possuem comprimento total de 395 cm são vivíparos placentários, com um período gestacional de aproximadamente 12 meses, podendo ter uma média de 1 a 15 filhotes por gestação (COMPAGNO, 1984).



Fig. 2. Tubarão *Carcharhinus longimanus*. Fonte: Fishbase, by Pais, M.

### 2.1.3. *Isurus oxyrinuchs*

Os tubarões Mako, Podendo chegar a 4 metros de comprimento, são vivíparos aplacentários (Ovofágicos), com um período de gestação variando de 15 a 18 meses e têm aproximadamente 4 a 16 filhotes por ninhada (COMPAGNO, 1984).



Fig. 3. Tubarão *Isurus oxyrinchus*. Fonte: Fishbase, by Bornatowski, H.

## 2.2. Estratégias reprodutivas

A viviparidade tem como principal característica reter no útero os embriões, durante todo o período de desenvolvimento, fazendo com que os mesmos nasçam cópias dos adultos. Este tipo de reprodução é dividida entre vivíparo aplacentária e placentária, dependendo da relação trófica da mãe com os filhotes (BUDKER, 1958).

Outro tipo de reprodução é a ovofágica, na qual a mãe apresenta um ovário bem maior em relação aos demais tipos reprodutivos, chegando a pesar mais de 5 Kg. Seus ovócitos são pequenos, variando entre 5 a 7 mm de diâmetro. Nessa modalidade reprodutiva algumas semanas, os embriões começam a se nutrir dos ovos produzidos pela mãe, apresentando desde o começo, uma dentição precoce temporária, que auxilia no rompimento dos mesmos e na ingestão de seu conteúdo (GILMORE *et al.*, 1983; GILMORE, 1993).

Algumas espécies de elasmobrânquios apresentam caracteres sexuais secundários. Machos usualmente são menores do que as fêmeas e os contornos do corpo geralmente mais delgados. A maturação sexual também aparenta ser mais rápida, assim como a duração do ciclo de vida. Entretanto, a mais importante característica sexual secundária em machos é o clasper (DODD *et al.*, 1983).

### 2.3. O Aparelho reprodutor feminino

Os ovários estão dispostos em par e suspensos por mesentérios na parte dianteira da cavidade do corpo, em posição análoga aos testículos dos machos. Composto pelo órgão epigonal, que apresenta histologicamente sua morfologia igual para ambos os sexos (TESHIMA, 1981). Em várias espécies de elasmobrânquios apenas um ovário é funcional. Formas ovíparas apresentam os dois ovários desenvolvidos e funcionais (DODD, 1983; HAMLETT e KOOB, 1999; CARRIER *et al.*, 2004; HAMLETT, 2007).

Já em famílias como a Carcharhinidae, apenas um ovário é funcional, normalmente o direito, com o outro se tornando vestigial (PRATT, 1988).

Os ovários são compostos por vasos sanguíneos, nervos e uma variação de ovócitos e ovogônias. A morfologia pode variar muito entre espécies, no entanto, esta variação se dá pela presença ou não de ovócitos vitelogênicos (quantidades e tamanhos), que variam de acordo com a estratégia reprodutiva adotada (PRATT, 1988).

Matthews (1950) e Pratt (1988) descrevem dois tipos de ovários: um encontrado em tubarões laminiformes e outro nos demais elasmobrânquios. A principal diferença organizacional entre os dois é a presença da cápsula ovariana, a qual, nos laminiformes está localizada dentro do órgão epigonal, que produz óvulos pequenos que variam entre 3 e 5 mm de diâmetro, para servirem como alimento na estratégia ovofágica, adotada por tubarões desta ordem. Para as outras espécies o ovário é externo e originado na superfície plana do órgão epigonal ou ainda suspenso diretamente do mesovário. Este tipo de ovário produz óvulos de tamanho relativamente grande, geralmente variando entre 20 e 60 mm de diâmetro.

Segundo Jonnes e Geen (1977) foram observadas fêmeas maduras em três fases: fase entre as gestações, fase com ovos nos úteros e fase com embriões livres nos úteros.

A maturidade sexual feminina pode ser determinada pela avaliação das condições do trato reprodutivo, notando-se a presença ou ausência de óvulos bem desenvolvidos nos ovários, ovos ou embriões nas tubas uterinas expandidas. Bass *et al.*, (1973) definiu que a fêmea de tubarão com óvulos no ovário e um útero ampliado, é considerada um animal adulto.

Embora os ovários e ovidutos comecem o desenvolvimento como estruturas pares, que muitas vezes se tornam assimétricas, em tubarões adultos, como *Scyliorhinus*, *Pristiophorus*, *Cacharhinus*, *Mustelus* e *Sphyrna*, o ovário direito é funcional e o esquerdo atrofiado, porém ambas as tubas uterinas estão presentes (DANIEL, 1928).

Os óvulos produzidos pelos ovários são transportados através de uma estrutura denominada oviduto, passando por pequenos tubos denominados óstios. Esta estrutura fica situada próxima e frontalmente aos ovários, com muitas espécies possuem apenas um óstio ligado aos ovários. Muitas vezes a fertilização pode ocorrer dentro do oviduto (DODD, 1983; HAMLETT e KOOB, 1999; CARRIER *et al.*, 2004; HAMLETT, 2007).

O oviduto pode ser dividido em duas partes: glândula nidamental (ou nidamental) e ovissaco (ou útero). A glândula nidamental secreta uma substância parecida com a albumina e também apresenta uma membrana colágena em torno dos ovos fertilizados, envolvendo-os com uma camada com função nutritiva e protetora. Os óvulos, ao chegarem à glândula, normalmente são fertilizados pelo espermatozóide localizados na parte superior do oviduto ou na própria glândula. Outra importante função da glândula nidamental é armazenar espermatozoides, os quais, em algumas espécies, pode durar meses. Posteriormente à glândula nidamental, o oviduto se alarga formando a porção denominada de ovissaco (também conhecida como "útero"). Esta parte é muito mais rica em vasos sanguíneos e é nessa porção que permanecem os embriões, durante todo o processo de gestação, no caso dos vivíparos. Em espécies ovíparas os ovos não repousam no útero e sim no substrato (CARRIER *et al.*, 2004; HAMLETT, 2007).

Em estudo com aproximadamente 20 espécies de Condrictes, foram examinados cortes histológicos dos ovários de espécimes ovíparas e vivíparas. Os resultados mostram que folículos de diferentes tamanhos (corpora atrética e corpora lútea) são mantidos juntos por uma rede de estroma formada por tecido conjuntivo. Além disso, durante a ovogênese e a foliculogênese, existe uma diferença granulosa entre estes dois tipos (GIACOMINI 1896; WALLACE 1903; CHAMPY & GLEY 1923; SAMUEL 1943, 1946; BABEL 1967, DODD 1983).

Nos *Mustelus manazo* e *Mustelus griseus*, no processo da ovogênese os ovócitos começam a se desenvolver com diâmetro entre 15 a 20  $\mu\text{m}$  e são

revestidos com duas a três células escamosas. Quando o seu diâmetro alcança 130 µm os ovócitos são revestidos por um epitélio simples plano. Ao atingirem 350 µm de diâmetro o epitélio folicular muda de simples escamoso para epitélio simples cúbico segundo Teshima (1981).

A camada externa do estroma ovariano é composta de muitos folículos primordiais, logo abaixo da túnica albugínea. Os folículos primordiais consistem em um ovócito primário, rodeado por uma camada de grandes e pequenas células escamosas do folículo (HAMLETT, 2007).

“Corpora atretica”, são folículos vitelogênicos que não ovularam e vão ser reabsorvidos, podendo estar presentes no ovário maduro e “corpora lútea” são folículos pós-ovulatórios em estágios de reconstrução ou atresia (WOURMS 1977, DODD, 1983).

Em muitas espécies (e.g: *Squalus acanthias*, *Chiloscyllium griseum*, *Heptanchus cinereus*, *Mustelus laevis*, *Scyliorhinus canicula*, *Scyliorhinus stellaris*, *Scymnus lichea*, *Spinax niger*), as células granulosas são cuboidais ou colunares e se tornam muito finas com extensões citoplasmáticas que atravessam a zona pelúcida celular entre o ovócito e a parede do folículo. Em outros casos (e.g: *Myliobatus bovina*, *Raja* spp.; *Scyllium* sp.; *Torpedo marmorata*, *Trygon violacea*) pequenas células cubóides diferenciam-se em células maiores, com grandes núcleos, enquanto outras células permanecem cuboidais ou colunares durante todo o período do desenvolvimento folicular.

Estudos ultra-estruturais do ovário da raia *Urobatis (Urolophus) jamaicensis*, ilustram uma associação direta do órgão epigonal com as células epiteliais cubóides, que cobrem o ovário e constituem o epitélio germinativo (HAMLETT *et al.*, 1999).

Abaixo do epitélio encontra-se a túnica albugínea, uma fina camada de tecido conjuntivo. A camada externa do estroma ovariano é constituída por muitos folículos primordiais, logo abaixo da túnica albugínea. Os folículos primordiais são constituídos por um ovócito primário, revestido por epitélio simples ou colunar. A vascularização é referida pela primeira vez apenas na periférica do epitélio folicular, dentro de uma camada fibrosa e uma camada da teca (HAMLETT *et al.*, 1999)

Todas as espécies, estudadas até agora, demonstraram que a zona pelúcida separa os ovócitos da parede do folículo, bem como uma lâmina basal entre as

camadas granulosa e da teca. Curiosamente, a zona pelúcida das duas espécies de tubarão (*Mustelus canis* e *Rhizoprionodon terraenovae*), cuja ultra-estrutura folicular tem sido estudada, é substancialmente mais espessa do que nos batoides (DAVENPORT, 2003).

As células granulosas da parede folicular também demonstram variações significativas entre espécies, ou seja, Squaliformes e Carchariniformes mantêm um único tipo de células colunares, enquanto Rajidae, Dasyatidae e Chimaeridae desenvolvem uma célula granulosa que é heterogênea. Por exemplo, em *Urobatis jamaicensis* (HAMLETT, 1999) e *U. halleri* (BABEL, 1967), as células colunares alternam com grandes células redondas que contêm substâncias, tipo lipídicas, compreendendo a camada granulosa, mas com a foliculogênese ocorre a diminuição dessas células em tamanho e elas desaparecem antes da ovulação (HAMLETT *et al.*, 1999).

#### **2.4. O Aparelho reprodutor masculino**

Ao contrário da maioria dos Osteícties, em que os óvulos e espermatozóides são jogados no ambiente para ocorrer à fertilização (fertilização externa), os Condrictes depositam o sêmen dentro do aparelho reprodutivo da fêmea. Os machos possuem órgãos copuladores denominados cláspes, também chamados de pterigopódios ou ainda mixopterígios. Este órgão, que consiste em uma modificação adaptada da margem interna da nadadeira pélvica, é sustentado pelo endoesqueleto e representa uma das duas principais características sinapomórficas que tornam os Condrictes um grupo monofilético (GROGAN e LUND, 2004; HAMLETT, 2007).

O órgão copulador é uma estrutura intromitente, cartilaginosa, que conduz o esperma até a fêmea (COMPAGNO, 1999). Na medida em que o animal cresce, o grau de calcificação dessa estrutura aumenta. O grau de rigidez dos cláspes é utilizado em determinações de estádios maturacionais, considerando-se que o indivíduo é adulto e, portanto, apto à reprodução, quando o cláspes apresenta sustentação cartilaginosa bem desenvolvida, tornando-o mais rígido (CLARK e VON SCHMIDT, 1965). O tecido e pele que formam o cláspes não têm características que favoreçam a ereção, como irrigação de vasos sanguíneos ou músculos especializados. A base do cláspes é denominada apópila e a parte terminal é denominada hipópila; estas duas extremidades são interligadas, formando um sulco condutor de esperma (COMPAGNO, 1988). Durante a cópula, o cláspes é flexionado

por músculos situados em sua base até que a apópila e a papila urogenital fiquem posicionadas de forma que torne possível a ejaculação, podendo o cláster atingir um ângulo de 90° em relação ao eixo longitudinal do corpo. Apenas um cláster é introduzido por vez. O formato do cláster pode variar, com alguns deles apresentados na estrutura mais complexo, capazes de se abrir como uma flor no interior da fêmea, expondo estruturas cartilaginosas em forma de ganchos e esporões que servem para fixá-lo na parede interna da cavidade genital feminina (COMPAGNO, 2001).

O aparelho reprodutor masculino é composto além do cláster, basicamente pelo testículo, que produz o esperma, e pelos ductos espermáticos, que são responsáveis pela transferência do esperma até a fêmea, bem como pela adição de fluidos complementares à eficácia desta transferência (HAMLETT, 2007)

Os testículos podem variar entre as espécies, tanto na morfologia quanto na disposição funcional. No tubarão-frade, *Cetorhinus maximus*, os testículos são dispostos dentro do órgão epigonal e são compostos de numerosos lóbulos distintos, separados por tecido conjuntivo (MATTHEWS, 1950). Pratt (1988) se refere a este tipo de testículo como radial, porque nele a zona germinativa é o centro do lóbulo e do desenvolvimento dos túbulos seminíferos, que estão dispostos radialmente do centro do lóbulo em direção à circunferência, onde ductos eferentes coletam os espermatozoides à medida que amadurecem. Os tubarões da ordem dos Lamniformes apresentam este tipo de testículo. Em carcharhinideos e sphyrnideos, os testículos se projetam a partir da superfície do órgão epigonal, sendo este um tipo de testículo classificado por Pratt (1988) como diamétrico. Um terceiro tipo de testículo apresenta elementos de ambas as descrições acima (diamétrica e radial) e é encontrado em algumas espécies demersais, sendo caracterizado por ausência de divisões lobulares, com tecidos germinativos e ducto eferente localizados na superfície do testículo.

Os dois testículos são presos na parte superior dianteira da cavidade abdominal. Com a maturidade sexual, o esperma é produzido em grupos que passam de cada testículo, através de pequenos ductos, para o interior de tubos conhecidos como epidídimos (também em pares). Cada epidídimo passa por trás e logo abaixo da coluna vertebral, na parede superior da cavidade do corpo. Um

viscoso fluído é secretado no epidídimo em torno do esperma, para produzir o sêmen, o qual nutre e ativa o esperma (DODD *et al.*, 1983).

A espermatogênese ocorre dentro dos testículos em estruturas denominadas ampolas. As ampolas são folículos esféricos situados no final de um sistema radial de túbulos, divididos em bandas concêntricas. Stanley (1966) descreve a unidade funcional do testículo como espermatocisto, uma estrutura esférica que contém muitos espermatoblastos compostos por células de Sertoli e células germinativas associadas. (STANLEY, 1966; DODD, 1983; PARSONS e GRIER, 1992; CARRIER *et al.*, 2004; HAMLETT *et al.*, 2007 E MELLINGER, 1965), em estudo sobre testículos de elasmobrânquios, demonstraram uma relação especial entre a célula de Sertoli e as células germinativas.

Segundo Roosen-Runge (1977), a espermatogênese compreende a história de vida de uma célula germinal masculina, através de uma série de fases (gonócitos, espermatogônias, espermatócitos, espermátides, espermatozóide) e uma seqüência definida de complexos eventos celulares, a proliferação mitótica; apoptose; meiose (o evento central da espermatogênese), e espermiogênese.

Teshima (1981) dividiu esse processo em duas fases: 1) a primeira seria a espermiocitogênese, onde as células espermatogênicas sofrem processo de divisão até espermátides; 2) enquanto o segundo estágio seria a espermiogênese, onde a espermátide sofre um processo de transformação para espermatozóide, não ocorrendo nenhuma divisão.

Nos *Mustelus manazo* e *M. griseus*, as cabeças dos espermatozoides são em forma de espiral. Isto também foi observado nos *Cetorhinus maximus*, *Cacharhinus dussumieri*, *Galeorhinus japonicus* e *Rhinobatus schlegeli* e *Scylliorhinus canicula* (METTEN, 1939). Diferindo de Metten, Moore (1895) identificou que as cabeças dos espermatozoides no *Scyllium canícula* e *S. catulua* não são em forma de espiral e sim, em forma de linha reta.

O sêmen é armazenado nas vesículas seminais e ampola seminal até ser utilizado. Tubarões de grande porte, como o peregrino, *Cetorhinus maximus*, uma das maiores espécies de tubarão, pode produzir aproximadamente 15 litros de sêmen. Em alguns Chondrichthyes o sêmen é armazenado em estruturas denominadas espermatóforos. Das vesículas seminais o sêmen flui por um orifício na papila urogenital situada dentro da cloaca. Durante a cópula o clássper se flexiona

sobre esta papila para receber o sêmen e conduzi-lo para dentro da fêmea. O esperma e o sêmen são transferidos do epidídimo para o interior de outro ducto, denominado ducto deferente, localizado na parte de trás da coluna vertebral (DODD *et al.*, 1983).

À parte anterior desse ducto chegam também às secreções liberadas pela Glândula de Leydig's (glândula que se prolonga a partir da porção anterior do rim). Essa substância, recebida no ducto, vai auxiliar muito para aumentar o volume do sêmen. O ducto deferente se alarga na medida em que passa sob o rim e se expande dentro da vesícula seminal e ampola seminal na parte mais posterior da cavidade do corpo (HAMLETT *et al.*, 2007).

Um par de sacos ou bolsas sifônicas pode ser encontrado sob a pele anteriormente aos clásperes em alguns tubarões do gênero *Squalus*, por exemplo. Os sacos sifônicos se estendem desde a parte anterior das nadadeiras pélvicas até o nível das nadadeiras peitorais. Em alguns casos não se desenvolvem tanto. Preenchido por fluído, a capacidade do saco sifônico pode ser medida em galões no caso de grandes tubarões. Além da musculatura característica, os sacos sifônicos possuem células glandulares que aparentemente secretam um produto rico em serotonina, a qual é um poderoso estimulante que auxilia na contração da musculatura do trato reprodutivo feminino (DODD *et al.*, 1983, HAMLETT *et al.*, 2007).

O testículo tem dois tipos de células principais: células germinais e células somáticas, que diferem na origem embrionária e na linhagem celular subsequente. Embora suas principais funções: espermatogênese e hormonal, se diferenciem desde os primeiros estágios do desenvolvimento testicular, no entanto, as atividades das células germinais e células somáticas são coordenadas e interdependentes (HAMLETT, 2007).

A unidade de auto-renovação das células germinativas nas populações de células estaminais, se originam no saco vitelino embrionário migrando posteriormente, para a crista gonadal, onde irão se localizar permanentemente no testículo (CHIEFFI, 1949).

Nos testículos maduros dos elasmobrânquios, a população de células-tronco está localizada na zona distinta germinal ou crista. As células estaminais são poucas

em número, mas são elas que promovem a fonte de ondas sucessivas de divisão e diferenciação das células germinativas necessárias para a espermatogênese. O que é notável sobre o desenvolvimento das células germinais masculinas nos vertebrados, em comparação com as células germinativas nas fêmeas, é que elas se desenvolvem, não como células individuais, mas como clones isogenéticos, isto é, células-filhas formadas por divisões sucessivas de uma única espermatogônia primária, às quais permanecem conectadas, estruturalmente e funcionalmente, por pontes intercelulares (MELLINGER, 1965).

Células de Sertoli são os elementos mais destacados do testículo de elasmobrânquios e compartilham uma origem comum com as células destinadas a partir do sistema de ductos coletores intra testiculares (CALLARD *et al.*, 1994). Desde as primeiras fases do desenvolvimento, as células de Sertoli estão intimamente associadas com a existência de células germinativas, dentro de uma anatomia distinta dos “espermatócitos”. Junções gap também são vistas entre as células de Sertoli adjacentes, nas regiões basal do plasmalema onde as duas células parecem ser fundidas e reforçadas por microfilamentos e túbulos do retículo endoplasmático liso (MOTNE & COLLENOT 1982).

Nos mamíferos, as células de Sertoli têm um papel de apoiar e fazer o suporte dos elementos germinativos, no controle de seus produtos secretados, como fonte e destino das moléculas envolvidas na regulação da espermatogênese (FAWCETT. 1975, GRISWOLD *et al.*, 1988; RITZEN *et al.*, 1989; CALLARD 1991). As informações disponíveis sugerem que as células de Sertoli dos elasmobrânquios desempenham funções semelhantes, mas várias características importantes as diferenciam das células de Sertoli dos mamíferos. Primeiro, as células de Sertoli do testículo maduro dos elasmobrânquios passam por ciclos de proliferação, diferenciação e degeneração (PUDNEY & CALLARD, 1986). As células de Sertoli dos mamíferos, por outro lado, geralmente deixam a divisão no início do desenvolvimento e tornam-se elementos permanentes do epitélio seminífero. Em segundo lugar, as células de Sertoli nos elasmobrânquios são associadas, e sincronizadas, com um único clone de células germinativas. Em contrapartida, uma única célula de Sertoli nos mamíferos está associada simultaneamente com 4 ou 5 diferentes fases de desenvolvimento das células germinativas. Isso ocorre porque novos clones de células germinativas proliferam e avançam em desenvolvimento

antes da conclusão de gerações anteriores. Em terceiro lugar, a capacidade operacional de células de Sertoli nos elasmobrânquios é para a produção de esteróides (CALLARD *et al.*, 1978). A célula de Sertoli em mamíferos é qualitativa e quantitativamente limitada à sua capacidade de sintetizar esteróides. Os marcadores de síntese de esteróides, incluindo um retículo endoplasmático agranular bem desenvolvido, e mitocôndrias com cristas no túbulo vesicular e numerosas gotas lipídicas, foram observados para determinação durante a espermatogênese em células de Sertoli da espécie *S. acanthias* (PUDNEY & CALLARD 1984).

A zona ampologênica consiste na espermatogônia, células de Sertoli e fibroblastos. A espermatogônia é facilmente separada das outras células, por apresentar um grande núcleo e um nucléolo proeminente. Em números de lócus na zona ampologênica, os dois tipos de células se dispõem próximas no mesmo grupo (DODD *et al.*, 1983).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a morfologia dos ovários e testículos de tubarões oceânicos capturados no Atlântico sul e Equatorial.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever morfologicamente o ovário do tubarão *Carcharhinus falciformis*;
- Caracterizar histologicamente o ovário do tubarão *Carcharhinus falciformis* em seus diferentes estágios de maturação;
- Descrever morfologicamente os testículos dos tubarões *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus longimanus* e *Carcharhinus falciformis*;
- Caracterizar histologicamente os testículos dos tubarões *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus longimanus* e *Carcharhinus falciformis* em seus diferentes estágios de maturação.

#### 4. REFERÊNCIAS

- BABEL T. S. Reproduction life history, and ecology of the round stingray, *Urolophus halleri* Cooper. *Calif Fish Game* 137:1–104, 1967.
- BASS, A. J; D'AUBREY, J. D; KISTNASAMY, N. Sharks of the east coast of southern Africa. I. The genus *Carcharhinus* (Carcharhinidae). Oceanographic Research Institute (Durban) Investigational Report No. 33, 1973.
- BEÇAK, W. ; PAULETE, J. Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro. 1976. V. 1. 305p.
- BEHMER, A.; CASTRO E TOLOSA, E. M.; NETO, A. G. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo / 255p. São Paulo. 1976.
- BONE, Q; ROBERTS, B. L. The density of elasmobranchs. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 49, 913–937, 1969
- BUDKER, P. La viviparité chez les sélachiens, in *Traité de Zoologie: Anatomie, Systematique, Biologie*. P. P. Grassé, Ed., Maison et Cie Editeurs Libraires de l'Académie de Médecine, Paris, 1755–1790, 1958.
- CLARK, E. e VON SCHMIDT, K. Sharks of the central Gulf Coast of Florida. *Mar. Sci.* 15:13–83, 1965.
- CHAMPY, C; GLEY, P. Observations cytologiques sur les ovocytes des poissons et de quelques autres vertébrés. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale* 19: 241-308, 1923.
- CALLARD, G. Reproduction in male elasmobranch fishes. Kinne,R.; KINNE-SAFFRAN, E.; Beyenbach, K. Oogenesis, spermatogenesis and Reproduction. 1991
- CALLARD, I. P. *et al.* Testicular regulation in non-mammalian vertebrates. **Biology of Reproduction**. P.16 -43, 1978.
- CORTEZ, E. Life History Patterns and Correlations in Sharks. **Rev. Fish. Sci.**, v.8, n;4, p.299-344, 2000.
- CARRIER, J. C.; PRATT JR, H. L.; CASTRO, J. I. Elasmobranch Reproduction. Pp.269-286. In Carrier, J.C., Musick, J.A., Heithaus, M.R., **Biology of Sharks and Their Relatives**. p. 269-286, 2004.
- COMPAGNO, L. J. V. FAO Species Catalogue. In *Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of sharks species known to date. Part 1-2. FAO Fish Synopsis*.p. 4:1-665. 1984.
- COMPAGNO, L. J. V. Alternative life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. **Environm. Biol. Fishes**, p. 33-75, 1990.
- COMPAGNO, L. J. V. *Sharks of the World: An Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date, Volume 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes)*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes 1(2). FAO, Rome. 269 pp, 2001.
- COMPAGNO, L. J. V. *Sharks of the order Carcharhiniformes*. Princeton University Press. 1988.
- Daniel, J. F. *The elasmobranch fishes*. Univ. Calif. Press, Berkeley. 1929.

DAVENPORT, I. R. **Comparative morphology of oogenesis pertaining to the evolution of extreme egg size in Chondrichthyan fishes.** 2003.

DODD, J. M. Reproduction in cartilaginous fishes (Chondrichthyes), in Fish Physiology, Vol. 9A. W. S. Hoar, D. J. Randall, and E. M. Donaldson, Eds., Academic Press, New York. 1983.

FAWCETT, D. W. **Ultrastructure and function of the Sertoli cell.** Handbook of Physiology, Male Reproductive System. American Physiological Society, Washington. vol. 5, p. 21-56, 1975.

GROGAN, E. D. LUND, R. Origin and relationships of early Chondrichthyes. PP. 3-31. IN J. C. CARRIER, J. A. Musick, and M. R. Heithaus (eds), Biology of Sharks and Their Relatives. CRC Press, Boca Raton, Florida. 2004.

GILMORE, R. G. Reproductive biology of lamnoid sharks. **Environmental Biology of Fishes.** P. 95-114, 1993

GIACOMINI, E. **Contributo all'istologia dell'ovario dei Selaci.** Rish. Lab. Anat. Norm. Univ. Roma. 5: 221-274. Griswold, M., Morales, C. and Sylvester, S. 1988. Molecular biology of the Sertoli cell. Oxford Review of Reproductive Biology 10: 124-161, 1896.

HAMLETT, W. C.; KOOB, T. **Female Reproductive System.** In W. C. Hamlett (Ed.), Sharks, Skates And Rays: The Biology Of Elasmobranchs Fishes. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. P. 398-443, 1896.

HAMLETT, W. C.. Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids, and chimaeras. Vol. 3. p.171- 200, 2007.

HAMLETT, W. C., JEZIOR, M. AND SPIELER, R. **Ultrastructural analysis of folliculogenesis in the ovary of the yellow spotted stingray Urolophus jamaicensis.** *Annals of Anatomy.* V.181: p. 159-172, 1999.

HAZIN, F.H. V., PINHEIRO, P. B.; BROADHURST, M. K. Further notes on reproduction of the blue shark, *Prionace glauca*, and a postulated migratory pattern in the South Atlantic Ocean. **Ciência e Cultura**, vol. 52, no. 2, p. 114-119, 2000.

HAZIN, F.H.V., *et al.* Distribution and relative abundance of the blue shark, *Prionace glauca*, in the southwestern equatorial Atlantic Ocean. **Fishery Bulletin**, U.S. Fish. Wildl. Serv., v.92, p.474-480, 1994a.

HOENIG, J.M.; GRUBER, S.H. Life-history patterns in the elasmobranchs: implications for fisheries management. In H.L. Pratt, J. R., Gruber, S.H., Taniuchi, T. **Elasmobranchs as living resources:** advances in the biology, ecology, systematics, and the status of fisheries. pp. 1–16, 1990.

HOLDEN, M.J. Fecundity of *Raja clavata* in British waters. *J. Cons. Int. Exp. Mer* 36 p. 110–118, 1975.

IUCN. IUCN Red List of Threatened Animals. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK., 1996

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. Local: São Paulo, editora: Livraria e editora Santos, p. 123, 1983.

- KOOB, T. J.; CALLARD, I. P. Reproductive endocrinology of female elasmobranchs: lessons from the little skate (*Leucoraja erinacea*) and spiny dogfish (*Squalus acanthias*). **Journal of Experimental Zoology**. V.284: p.557-574, 1999.
- LUTTON, B. CALLARD, I.P. The elasmobranch epigonal organ-ovary complex (EOC): regulation of apoptosis by sex hormones. Abstract: Proceedings of the International Conference of Comparative Endocrinology, 2005.
- MATTHEWS, L. H. Reproduction in the basking shark, *Cetorhinus maximus* Phil. Trans. Roy. Soc. London. V. 234, p. 247-316, 1950.
- METTEN, H. Studies on the reproduction of the dogfish, Phil. Trans. Roy. Soc. London. V. 230, p.217-238, 1939.
- MOORE, J.E.S. ON the structural change in the reproductive cells during the spermatogenesis of elasmobranchs. **Quart. J. Micr. Sci.** v.38, p.275-313, 1985.
- MELLINGER, J. Stades de la spermatogenesechez *Scyliorhinus caniculus*: description,données histochimiques, variations normales et expérimentales. Zeitschrift für Zellforschung. V. 67, p. 653-673, 1965.
- MOYNE, G. COLLENOT, G. Unusual nucleolar fine structure in the Sertoli cells of the dogfish *Scyliorhinus canicula*. **Biology of the Cell**. V. 44, p. 239-48, 1982.
- PARSONS, G. R. H. J. GRIER. 1992. Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. J. Exp. Zool. 261:173–184.
- PRATT, H. L. Elasmobranch gonad structure a description and survey. Copeia. P.719–729, 1988.
- PUDNEY, J. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: Russel, L. D., Griswold, M. D. **The Sertoli cell**. Cache River Press, Clearwater, FL, p 611–675, 1993.
- RITZEN, E. M., HANSSON, V. FRENCH, F. S. The Sertoli cell. In B. deKrester (ed.), *The Testis*, New York, Raven Press. p. 269-302, 1989.
- ROOSEN-RUNGE. *The Process of Spermatogenesis in Animals*. **Cambridge University Press**. P. 1-214, 1977..
- SAMUEL, M. Studies on the corpus luteum in *Rhinobatus granulatus* Cuvier. **Proceedings of the Indian Academy of Science**. V. 18B, p. 133-157, 1943.
- SAMUEL, M. The corpus luteum in *Chiloscyllium griseum* (Muller and Henle). **Proceedings of the Indian Academy of Science**. V.22B, p. 113-123, 1946.
- STEHMANN, M. F. W. Proposal of a maturity stages scale for oviparous and viviparous cartilaginous fishes (Pisces, Chondrichthyes). **Arquive of Fishery and Marine Research**. Res. 50 (1),p. 23-48, 2002.
- STANLEY, H. P. The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). **Z. Zellforsch.** V.7, p.:453–468, 1966.
- TESHIMA, K. Studies on the reproduction of Japanese dogfishes, *Mustelus manazo* and *M. griseus*. J. **Shimonoseki Univ. Fish**. V.29, p.113-199, 1981.

WALLACE, W. Observations on ovarian ova and follicles in certain teleostian and elasmobranch fishes. **Quart. Jour. Mic. Sci.** v.47, n. 186, p.161–213, 1903.

WOURMS, J. P. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. **Am. Zool.** V.17,p. 379–410, 1977.

**Análise morfológica do ovário do tubarão lombo preto *Carcharhinus falciformis* (Müller & Henle, 1839) capturados no Atlântico Sul e Equatorial**

Mariana G. Rêgo<sup>1</sup>, Fábio H. V. Hazin<sup>1</sup>, Joaquim Evêncio Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aqüicultura, Laboratório de Oceanografia Pesqueira, rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP:52.171-900. Phone 55-81-33206510 /55-81-33206500/Fax:55-81-33206512.

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, área Histologia, rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP:52.171-900. Fone: 81-33206387.

E-mail: [evencio@dmfa.ufrpe.br](mailto:evencio@dmfa.ufrpe.br)

### **Resumo**

Este trabalho tem por objetivo estudar a morfologia dos ovários dos tubarões oceânicos (*Carcharhinus falciformis*) capturados no Atlântico Sul e Equatorial. As amostras foram coletadas, entre janeiro de 2008 e março de 2010 através das embarcações da frota atuneira, onde foram coletados 17 fêmeas. Após o embarque dos animais, os mesmos amostrados foram caracterizados morfometricamente, coletando-se, em seguida as vísceras que foram etiquetadas e acondicionadas em gelo. Para a análise histológica, foi seguido o protocolo de fixação, desidratação e inclusão em parafina. Em seguida, foram cortados em micrótomo (5 µm) e corados pela Hematoxilina/Eosina-Floxina e Tricrômico de Gomori. Dos 17 ovários, analisados macroscopicamente o ovário se encontravam suspensos por mesentérios na parte dianteira da cavidade do corpo. Foi observado que os ovários do tubarão lombo preto são bastante irrigados

por vasos sanguíneos, contendo uma grande variação de ovócitos. Na análise macroscópica dos ovários foram encontrados três estágios maturacionais distintos: estágio I (Imaturo), estágio II (em maturação) e estágio III (Maduro). No estágio I foram classificados 3 ovários imaturos, no estágio II 5 ovários em maturação e no estágio III 9 ovários maduros. Nas fêmeas imaturas foram encontrados ovários pequenos com largura entre 1,0 e 3,1 cm, com estrutura interna gelatinosa ou granular, nas fêmeas em maturação, os ovários se encontravam um pouco maiores apresentando largura variando de 5,2 e 6,0 cm e nos ovários maduros possuía largura variando entre 6,5 e 7,8 cm, apresentando um formato arredondado, com ovócitos grandes e bem desenvolvidos. Na análise microscópica foi observado que os ovários são revestidos por tecido epitelial simples plano, nos primeiros estágios de desenvolvimento, variando para simples cúbico nos estágios finais da maturação. Logo abaixo do epitélio se encontra a albugínea composta por tecido conjuntivo denso e regiões de fibras musculares. No estágio inicial de maturação os ovários apresentam o órgão epigonal, não diferenciando-se histologicamente do ovário. Já nos ovários maduros foi evidenciado o epitélio simples cúbico, logo abaixo do epitélio encontra-se uma camada de tecido conjuntivo denso e uma camada muscular com presença de ovócitos vitelogênicos e células adiposas. Evidenciou-se também uma fina membrana vitelínica delimitando os ovócitos. Foi observada a zona pelúcida separando os ovócitos da parede do folículo e uma lâmina basal entre as camadas granulosas e a camada da teca.

**Palavras-chave:** Elasmobrânquios, ovário, histologia.

## **1. Introdução**

Os elasmobrânquios compartilham de algumas características reprodutivas bem particulares como, por exemplo, o dimorfismo sexual externo, fertilização interna, disposição de órgãos reprodutores em pares, baixa taxa de fecundidade, maturação sexual tardia,

diversidade de estratégias de desenvolvimento embrionário e uma aparente ausência de cuidados parentais (Dood, 1983).

De um modo geral, os tubarões possuem diversas estratégias reprodutivas, variando morfológicamente e fisiologicamente, mesmo dentro de um único grupo. No entanto, existem vários modos de reprodução, incluindo oviparidade e diversas versões de viviparidade, que foram bem definidos para os tubarões. Estas variações têm sido tradicionalmente classificadas como ovíparos, ovovivíparos e vivíparos (Lutton *et al* 2005 e Wourms, 1977) .

A viviparidade é conhecida, pelos seus neonatos já nascerem bem desenvolvidos, pois seu desenvolvimento se dá internamente, no ovissaco (útero) da mãe. Esta estratégia está presente em 56% dos Chondrichthyes, portanto a maioria. As formas mais “primitivas” de viviparidade (a lecitotrófica e a ovofágica) são denominadas também como ovovivíparas. As mais derivadas ou “evoluídas” (placentotrófica e uterina) são também conhecidas por viviparidade matotrófica, onde o grau de dependência nutricional do embrião em relação à mãe. O embrião tem nutrição através do saco vitelínico, onde a superfície do saco fica em contato com a parede uterina, e o tecido da mãe e da prole cresce em íntimo contato, formando a placenta. Uma vez que a placenta é formada, os nutrientes podem ser desviados para o embrião através da corrente sanguínea da mãe (Carrier, et al., 2004).

O sistema reprodutivo das fêmeas de tubarões é constituído basicamente de um par de ovários e ovidutos. Os ovários são ligados à parede dorsal da cavidade abdominal pelo mesentério e possuem três funções principais: gerar células germinativas, acumular vitelo e sintetizar e secretar hormônios (Hamlett e Koob, 1999).

Este trabalho tem por objetivo estudar a morfologia dos ovários do tubarão oceânico (*Carcharhinus falciformis*) capturados no Atlântico Sul e Equatorial

## 2. Material e Métodos

As amostras foram coletadas, entre janeiro de 2008 e março de 2010, capturados pela frota atuneira, no Atlântico Sul e Equatorial, tendo sido examinados 17 fêmeas. Nas embarcações, os observadores de bordo retiraram o trato visceral dos animais e o Comprimento Total (CT) e o Pré-caudal (PC) medidos em centímetros. Após as aferições as vísceras foram etiquetadas e acondicionadas em gelo.

Após o desembarque as amostras foram enviadas para a Universidade Federal Rural de Pernambuco, devidamente congeladas, para posterior triagem no Laboratório de Oceanografia Pesqueira do Departamento de Pesca e Aqüicultura.

Após a triagem, os ovários foram pesados e medidos (comprimento e largura), tendo sido, em seguida, identificados macroscopicamente quanto ao seu estado maturacional, segundo Stehmann (2002). Para a realização da análise histológica do material, os ovários foram fixados em formol a 10% com água do mar, por 48 horas, sofrendo clivagem no intervalo de 24 horas e retornando à solução fixadora. Após a fixação as peças foram transferidas para o álcool a 70% e posteriormente desidratadas em etanol em ordem crescente de 80% a 100%, diafanizadas pelo xilol e incluídas em parafina (Beçak e Paulete, 1976; Behmer *et al.*, 1976; Junqueira e Junqueira, 1983).

Após a inclusão, o material foi cortado em micrótomo ajustado para 5 µm com as secções tendo sido dispostas em lâminas previamente untadas com albumina de MAYER, e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem, segundo a metodologia de Junqueira & Junqueira (1983). Posteriormente, os cortes obtidos foram corados pela Hematoxilina/Eosina-Floxina e Tricrômico de Gomori. Para a análise morfológica foi utilizado um Microscópio Biológico Trinocular NIKON 50i acoplado a um sistema de captura de imagem Microscópica.

As nossas fotografias foram da análise dos ovários maduros, uma vez que, as laminas dos ovários imaturos e em maturação, não se evidenciaram boas para fotografar.

### **3. Resultados**

Na análise macroscópica dos ovários foram encontrados três estágios maturacionais distintos: estágio I (Imaturo), estágio II (em maturação) e estágio III (Maduro).

No estágio I foram classificados 3 ovários imaturos, no estágio II 5 ovários em maturação e no estágio III 9 ovários maduros (Tabela 1).

#### **Descrição Macroscópica dos ovários**

Nos tubarões lombo preto (*Carcharhinus falciformis*) os ovários encontram-se suspensos pelo mesentério na parte cranial da cavidade abdominal, apresentando-se ricos em vasos sanguíneos e com presença de folículos em diferentes estágios de maturação.

Nas fêmeas imaturas foram encontrados ovários pequenos com largura entre 1,0 e 3,1 cm, com estrutura interna gelatinosa ou granular; ovócitos indiferenciados mostrando-se uniformemente pequenos ou granulares, com diâmetro não variando de 0,2 cm (Fig. 1). Podendo visualizar que o mesmo se encontra na superfície do órgão epigonal, tendo sido identificado pela coloração esbranquiçada, enquanto o órgão epigonal apresentava tonalidade rosa claro.

Nas fêmeas em maturação, os ovários se encontravam um pouco maiores apresentando largura variando de 5,2 a 6,0 cm, com paredes transparentes e presença de ovócitos em processo de diferenciação maturacional com diâmetro variando 1,0 e 2,0 cm.

Os ovários maduros possuía largura média de 7,8 cm, apresentando um formato arredondado, com ovócitos grandes e bem desenvolvidos, podendo também visualizar ovócitos com diâmetros menores (1,0 e 1,5 cm) que possivelmente irão se desenvolver na próxima

gestação. Já os ovócitos maiores (vitelogênicos) apresentavam uma variação do diâmetro de 2,5 e 3,0 cm (Fig. 2). Sua coloração é bastante avermelhada com ovócitos bem amarelados.

### **Descrição Microscópica dos ovários (tabela e peso)**

Os ovários são revestidos por tecido epitelial simples plano, nos primeiros estágios de desenvolvimento (Fig. 3 B), variando para simples cúbico nos estágios finais da maturação (Fig. 3 F). Logo abaixo do epitélio se encontra a albugínea composta por tecido conjuntivo denso e regiões de fibras musculares (Fig. 3 F).

No estágio inicial de maturação os ovários apresentam o órgão epigonal, não diferenciando-se histologicamente do ovário.

Nos ovários maduros foi evidenciado o epitélio simples cúbico, logo abaixo do epitélio encontra-se uma camada de tecido conjuntivo denso e uma camada muscular (Fig. 3 C) com presença de ovócitos vitelogênicos e células adiposas (Fig. 3 E). Evidenciou-se também uma fina membrana vitelínica delimitando os ovócitos (Fig. 3 B). Foi observada a zona pelúcida separando os ovócitos da parede do folículo e uma lâmina basal entre as camadas granulosas e a camada da teca (Fig. 3 D).

### **4. Discussão**

De acordo com os trabalhos de Dodd, 1983; Hamlett e Koob, 1999; Carrier *et al*, 2004; Hamlett, 2007, os ovários estão dispostos em par e suspensos por mesentérios na parte dianteira da cavidade do corpo, em posição análoga aos testículos nos machos. Em várias espécies de elasmobrânquios apenas um ovário é funcional como nas espécies *Carcharhinus*, *Mustelus* e *Sphyrna*. Formas ovíparas apresentam ambos os ovários desenvolvidos e funcionais como, por exemplo, espécies de *Carcharhinus anguineus*, *Pristis cuspidatus* e *Squalus brevirostris*, da mesma forma encontrada na espécie *Carcharhinus falciformis* do presente trabalho.

Pratt (1988) observou que os ovários são compostos por vasos sanguíneos, nervos e uma variação de ovócitos e ovogônias. A morfologia pode variar muito entre espécies, no entanto, esta variação se dá pela presença ou não de ovócitos vitelogênicos, que variam de acordo com a estratégia reprodutiva adotada (Oviparidade. Viviparidade placentária e aplacentaria). No caso deste trabalho a espécie estudada apresenta a viviparidade como estratégia reprodutiva e seu ovário dispõe macroscopicamente de uma variação dos diâmetros dos ovócitos vitelogênicos.

Matthews (1950) e Pratt (1998) descrevem dois tipos de ovários: um encontrado em tubarões laminiformes e outro nos demais elasmobrânquios. A principal diferença organizacional entre os dois é a presença da cápsula ovariana, sendo para os laminiformes localizada dentro do órgão epigonal, produzindo ovócitos pequenos que variam entre 3 e 5 mm de diâmetro, servindo como alimento em estratégia ovofágica, adotada por tubarões desta ordem. Para as outras espécies o ovário é externo e originado na superfície plana do órgão epigonal ou ainda suspenso diretamente do mesovarium. Este tipo de ovário produz ovos de tamanho relativamente grandes, geralmente variando entre 20 e 60 mm de diâmetro, como no caso dos *Carcharhinus falciformis* que apresentam a mesma característica.

A camada externa do estroma ovariano é composta de muitos folículos primordiais, logo abaixo da túnica albugínea. Os folículos primordiais consistem em um ovócito primário, rodeado por uma camada de grandes e pequenas células escamosas do folículo. Esse nossos achados corroboram com os descritos por Hamlett (2007),

Hamlett *et al.* (1999) evidenciou que as células granulosas da parede folicular também demonstram variações significativas entre espécies, ou seja, Squaliformes e Carchariniformes mantêm um único tipo de células colunares, enquanto Rajidae, Dasyatidae e Chimaeridae desenvolvem células granulosas heterogêneas. Por exemplo, em *Urobatis jamaicensis* e *U. halleri*, as células colunares alternam com grandes células cúbicas que contêm substâncias, tipo

lipídicas, compreendendo a camada granulosa, mas com a foliculogênese ocorre a diminuição dessas células em tamanho e elas desaparecem antes da ovulação. No Tubarão lombo preto as células colunares se apresentam da mesma maneira no desenvolvimento ovariano.

Nos *Mustelus manazo* e *Mustelus griseus*, no processo da ovogênese os ovócitos começam a se desenvolver com diâmetro entre 15 a 20  $\mu\text{m}$  e são revestidos com duas a três células escamosas. Quando o seu diâmetro alcança 130  $\mu\text{m}$  os ovócitos são revestidos por uma camada simples de células escamosas. Ao atingirem 350  $\mu\text{m}$  de diâmetro o epitélio folicular muda de simples escamoso para epitélio simples cúbico Teshima (1981). Para o lombo preto ocorre esta mesma mudança assim que seus ovócitos começam a desenvolver.

Todas as espécies, estudadas até agora, demonstraram que a zona pelúcida separa os ovócitos da parede do folículo, bem como existe uma lâmina basal entre as camadas granulosa e da teca. Curiosamente, a zona pelúcida das duas espécies de tubarão (*Mustelus canis* e *Rhizoprionodon terraenovae*), cuja ultra-estrutura folicular tem sido estudada, é substancialmente mais espessa do que nos batoides (Davenport, 2003).

## 5. Conclusão

A análise macroscópica dos ovários apontou três estágios maturacionais distintos, de modo que os estágios iniciais e intermediários caracterizam indivíduos jovens e os estágios finais ou avançados indivíduos adultos, variando ainda esse desenvolvimento de acordo com a espécie.

A análise microscópica confirmou que o estágio I caracteriza-se pela presença do órgão epigonal que nessa fase é indiferenciado do ovário, apresentando assim a mesma constituição histológica. No estágio II há uma diminuição do órgão epigonal e a diferenciação do ovário com o surgimento das primeiras células germinativas (ovogônias). No estágio III o órgão epigonal se apresenta apenas como uma fina camada revestindo o ovário, este encontra-se bastante desenvolvido com presença de ovócitos grandes e com bastante atividade vitelogênica.

## 6. Agradecimentos

A MPA que financiou o Projeto Tubarões Oceânicos do Brasil. A FACEPE pela bolsa de mestrado da autora Mariana Gomes do Rêgo e aos observadores de bordo pelo apoio na obtenção das amostras.

## 7. Referencias

- Beçak, W. ; Paulete, J. 1976. Técnicas de Citologia e Histologia. V. 1. 305p. Rio de Janeiro.
- Behmer, A.; Castro de Tolosa, E. M.; Neto, A. G. F. 1976. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo / Departamento de Cirurgia, 255p. São Paulo.
- Carrier, J. C., Pratt Jr, H. L. and Castro, J. I. 2004. Elasmobranch Reproduction. Pp.269-286. In J. C. Carrier, J. A. Musick and M. R. Heithaus (eds), *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, LLC. Boca Raton.
- Davenport, I. R. 2003. Comparative morphology of oogenesis pertaining to the evolution of extreme egg size in chondrichthyan fishes. Ph.d. Thesis. Clemson University, Clemson, south Carolina.
- Dodd, J. M. 1983. Reproduction in cartilaginous fishes (Chondrichthyes), in *Fish Physiology*, Vol. 9A. W. S. Hoar, D. J. Randall, and E. M. Donaldson, Eds., Academic Press, New York.
- Hamlett, W. C. 2007. Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids, and chimaeras. Vol. 3. pp. 237- 281.
- Hamlett, W. C., Jezior, M. and Spieler, R. 1999. Ultrastructural analysis of folliculogenesis in the ovary of the yellow spotted stingray *Urolophus jamaicensis*. *Annals of Anatomy* 181: 159-172.
- Junqueira, L. C.; Junqueira, L. M. M. S. 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. Livraria e editora Santos, 123p. São Paulo.

- Koob, T. J. and Callard, I. P. 1999. Reproductive endocrinology of female elasmobranchs: lessons from the little skate (*Leucoraja erinacea*) and spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Journal of Experimental Zoology* 284: 557-574.
- Lutton, B. and Callard, I.P. 2005. The elasmobranch epigonal organ-ovary complex (EOC): regulation of apoptosis by sex hormones. Abstract: Proceedings of the International Conference of Comparative Endocrinology.
- Matthews, L.H. 1950. Reproduction in the basking shark, (*Cetorhinus maximus*) GUNNER. *Phil. Trans. Roy. Soc. London. Series B*, 234: 247-316.
- Pratt, H. L. 1988. Elasmobranch gonad structure a description and survey. *Copeia* 1988:719–729.
- Stehmann, M. F. W. 2002. Proposal of a maturity stages scale for oviparous and viviparous cartilaginous fishes (Pisces, Chondrichthyes). *Arquive of Fishery and Marine Research. Res.* 50 (1), 23-48.
- Wourms, J. P. 1977. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *Amer. Zool.*, 17(2): 379-410.

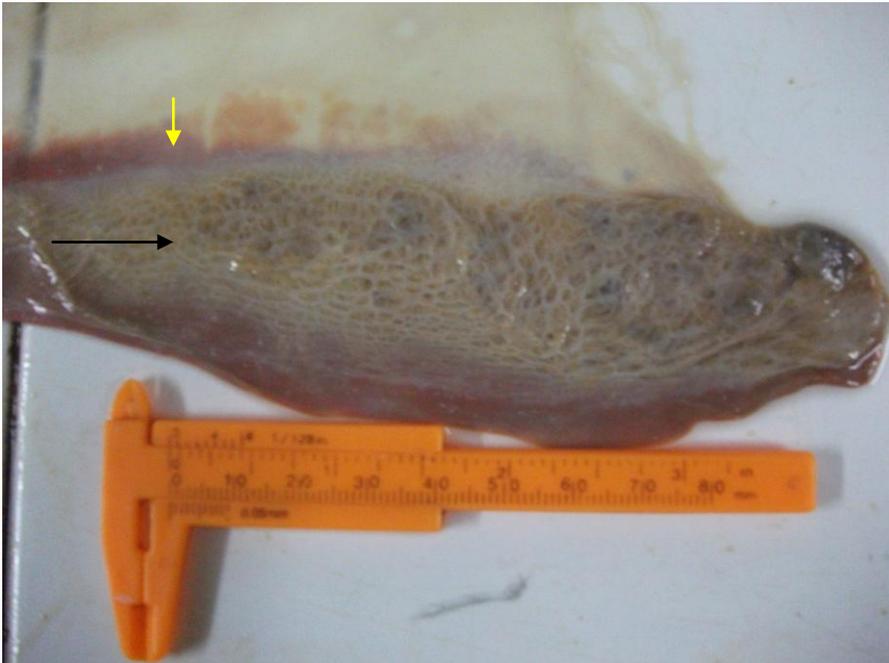


Fig. 1. Foto do ovário imaturo do Tubarão *Carcharhinus falciformis*, evidenciando órgão epigonal (seta preta) e com ovócitos indiferenciados (seta amarela).

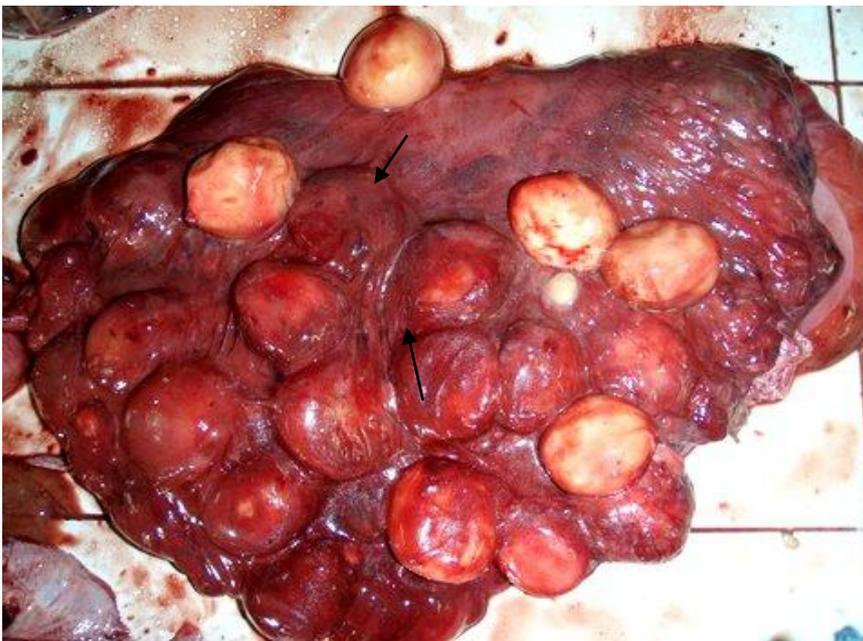


Fig. 2. Foto do ovário maduro do Tubarão *Carcharhinus falciformis*, evidenciando Ovócitos em diferentes diâmetros (setas).

Tabela 1. Relação entre o estágio maturacional do *Carcharhinus falciformis*, comprimento do animal e peso do ovário

<b>Estagio Maturacional</b>	<b>Comprimento mínimo</b>	<b>Comprimento maximo</b>	<b>Peso do ovário (G)</b>
Imatura	70	133	60 - 93
Em maturação	185	200	110 - 195
Madura	240	285	220 - 405

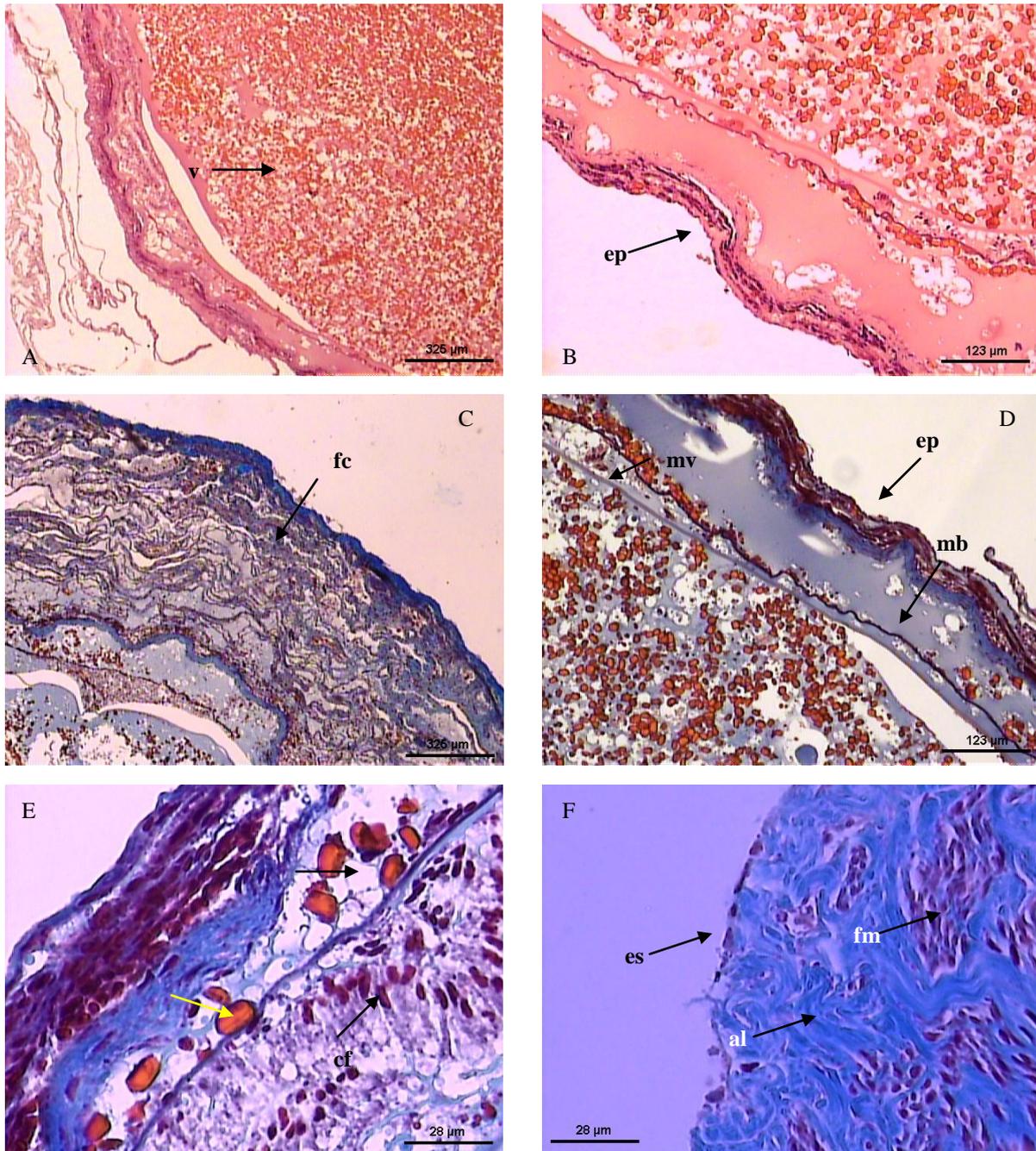


Figura 3. Fotomicrografia de Ovário maduro do Tubarão Lombo Preto (*Carcharhinus falciformis*). A – Ovócito maduro (rico em vitelo) Coloração: H.E.; B – epitélio (ep) e membrana vitelínica (mv) Coloração: H.E C - fibras do conjuntivo, Coloração: Tricromico de Gomori; D - epitélio (ep) e membrana vitelínica (mv) e membrana basal (mb) Coloração: H.E. Aumento coloração tricromico de gomori. E – membrana vitelinica (mv), Células de gordura (seta), células foliculares (cf) e vitelo (seta amarela) Coloração: Tricromico de Gomori. F- Epitélio simples (es) com células cubóides, albugínea composta por tecido conjuntivo denso (al) e regiões com fibras musculares (fm) Coloração: Tricromico de Gomori.

## **Análise morfológica dos testículos de tubarões oceânicos capturados no atlântico sul e Equatorial**

Mariana G. Rêgo<sup>1</sup>, Fábio H. V. Hazin<sup>1</sup>, Joaquim Evêncio Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aqüicultura, Laboratório de Oceanografia Pesqueira, rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP:52.171-900. Phone 55-81-33206510 /55-81-33206500/Fax:55-81-33206512.

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, área de Histologia, rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP:52.171-900. Fone: 81-33206387.

E-mail: [evencio@dmfa.ufrpe.br](mailto:evencio@dmfa.ufrpe.br)

### **Resumo**

Este trabalho tem por objetivo estudar a morfologia dos testículos dos tubarões *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus longimanus* e *Carcharhinus falciformis* capturados no Atlântico Sul e Equatorial. As amostras foram coletadas entre dezembro de 2008 e março de 2010, através das embarcações da frota atuneira, sendo coletados 164 indivíduos. Após o embarque dos animais, os mesmos amostrados foram caracterizados morfometricamente, coletando-se, em seguida as vísceras que foram etiquetadas e acondicionadas em gelo. Para a análise histológica, foi seguido o protocolo de fixação, desidratação e inclusão em parafina. Em seguida, foram cortados em micrótomo (5 µm) e corados pela Hematoxilina/Eosina-Floxina e Tricrômico de Gomori. Do total de 164 indivíduos, sendo que 52 *Isurus oxyrinchus*, 17 *Carcharhinus falciformis* e 95 *Carcharhinus longimanus*. Para a três espécies estudadas foi observada que a

variação nos três estágios maturacionais proposto não tiveram alteração morfológica visível. Para a caracterização microscópica, o desenvolvimento celular nos três estágios maturacionais, também se apresentou o mesmo para as três espécies estudadas. No estágio I caracterizou-se pela presença do órgão epigonal que nessa fase é indiferenciado do testículo, apresentando assim a mesma constituição histológica. No estágio II há uma diminuição do órgão epigonal e a diferenciação do testículo com o surgimento das primeiras células germinativas (espermatogônias). No estágio III o órgão epigonal se apresenta apenas como uma fina camada revestindo o testículo, este encontra-se bastante desenvolvido com presença de túbulos seminíferos grandes e com grande quantidade de espermatozoides. Já na classificação da disposição morfológica dos testículos ocorreu diferença, uma vez que, na espécie *Isurus*, evidenciou-se Radial e para os *Carcharhinus* foi denominada como diamétrica

**Palavras-chave:** Elasmobrânquios, testículo, histologia

## 1. Introdução

A reprodução dos tubarões, ao contrário dos peixes ósseos, ocorre por fecundação interna, com o macho introduzindo seu órgão sexual, denominado cláasper, no oviduto da fêmea, por meio do qual o esperma introduzido (Carrier *et al.*, 2004).

O cláasper é uma estrutura intromitente, cartilaginosa (Compagno, 1999). Na medida em que o animal cresce, o grau de calcificação dessa estrutura aumenta. O grau de rigidez dos cláaspers é utilizado em determinações de estádios maturacionais, considerando-se que o indivíduo é adulto e, portanto, apto à reprodução, quando o cláasper apresenta sustentação cartilaginosa bem desenvolvida, tornando-o mais rígido (Clark e Von Schmidt, 1965).

O sistema reprodutor masculino é composto pelos testículos, ductos genitais (canal eferente, epidídimo, canal deferente e vesícula seminal), glândulas acessórias e os órgãos sexuais secundários. Os testículos são estruturas pares, apoiadas por um mesentério, localizados

internamente na parte superior da cavidade abdominal e são formados pelo começo e fim dos pares de órgãos epigonais, suspensos pela fina membrana basal, ao lado da cavidade peritoneal (Pratt, 1988).

Os espermatozoides maduros são descarregados a partir do testículo, através do canal eferente que participa do epidídimo e se expande para formar um longo tubo até o canal deferente, também conhecido como ducto de Wolff, até atingir a vesícula seminal ou ampola do ducto deferente que são áreas de armazenamento de produtos seminais (Wourms, 1977).

Para uma melhor compreensão do desenvolvimento celular e da variação dos tecidos nos diferentes estágios maturacionais dos testículos, este trabalho tem por objetivo estudar a morfologia dos testículos dos tubarões *Isurus Oxyrinchus*, *Cracharhinus longimanus* e *Carcharhinus falciformis* capturados no Atlântico Sul e Equatorial.

## **2. Material e Métodos**

Durante o período de dezembro de 2008 a março de 2010, foram coletados 164 indivíduos, capturados no Atlântico Sul e Equatorial, ao longo de 16 cruzeiros, realizados por embarcações espinheleira. Após a captura, os exemplares, foram eviscerados pelos Observadores de bordo, tendo seu material visceral sido coletado, sendo todos os indivíduos amostrados caracterizados morfometricamente, registrando-se o Comprimento Total (CT) e Pré-caudal (PC) medidos em cm e comprimento do cláspere aferido também em cm, observando-se ainda a grande calcificação do mesmo. Após as aferições as vísceras foram etiquetadas e acondicionadas em gelo. Em seguida as amostras foram enviadas para a Universidade Federal Rural de Pernambuco tendo sido, devidamente congeladas para posterior triagem no Laboratório de Oceanografia Pesqueira do Departamento de Pesca e Aqüicultura.

Em laboratório as vísceras foram separadas quanto ao trato digestório e aparelho reprodutor, com os testículos tendo sido posteriormente submetidos a aferições do seu peso,

comprimento e largura, sendo e seu estado maturacional identificado macroscopicamente, segundo Stehmann (2002).

Para a realização da análise histológica, os testículos foram fixados em líquido de bouin por 48 horas, sofrendo clivagem no intervalo de 24 horas e retornando à solução fixadora. Após a fixação as peças foram transferidas para o álcool a 70% e posteriormente desidratadas em etanol em ordem crescente de 80% a 100%, diafanizadas pelo xilol e incluídas em parafina (Beçak e Paulete, 1976; Behmer *et al.*, 1976; Junqueira e Junqueira, 1983).

Após a inclusão, o material foi cortado em micrótomo ajustado para 5  $\mu\text{m}$ , com as reações tendo sido dispostas mesmo foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de MAYER, e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem, segundo a metodologia de Junqueira & Junqueira (1983). Posteriormente os cortes obtidos foram corados pela Hematoxilina/Eosina-Floxina e Mistura Tricrômica de Gomori. Para a análise morfológica foi utilizado um Microscópio Biológico Trinocular NIKON 50i acoplado a um sistema de captura de imagem Microscópica.

### **3. Resultados**

Foram analisados macroscopicamente 164 indivíduos, sendo que 52 Makos, 17 lombo preto e 95 galha branca oceânico. Evidenciando o desenvolvimento celular em cada estágio (imaturo, em maturação e maduro).

#### **Descrição Macroscópica dos testículos**

Os testículos dos tubarões são dispostos em par, encontrando-se presos por uma fina membrana basal na cavidade peritoneal. São formados pelos órgãos epigonais, disposto da porção ântero-posterior, sendo considerado um órgão hematopoiético (produção de células sanguíneas), auxiliando na nutrição dos testículos. Nos indivíduos jovens ou imaturos os cláspers se encontravam pequenos e flexíveis, e os testículos não se diferenciavam do órgão epigonal (Fig.1), apresentando também ducto espermático em linha reta e coloração é

esbranquiçada. Nos indivíduos em maturação, encontram-se espermatozóides, o cláster longo, semi calcificado, ultrapassando o comprimento da nadadeira pélvica, e os testículos aparentemente mais desenvolvidos e ductos espermáticos começando a aumentar. Quando o cláster se encontrava rígido (calcificado), os testículos se mostravam nitidamente maduros, largos e arredondados, muitas vezes de coloração avermelhada (Fig. 2) e preenchido de fluido espermático. Para cada espécie foi identificado uma variação no comprimento total do animal com relação à largura do testículo e seu estágio maturacional.

Para o tubarão Mako (*Isurus oxyrinchus*), foram identificados 5 testículos imaturos com largura variando de 1,2 e 1,36 cm e o animal variando seu comprimento total entre 107 e 154 cm, 13 em maturação variando sua largura entre 2,4 e 3,3 cm e o comprimento total do animal 182 e 195 cm e 24 testículos maduros com largura variando entre 3,5 e 6,9 cm e o animal com comprimento total variando entre 200 e 250 cm.

Para o tubarão lombo preto (*Carcharhinus falciformis*), foram classificados 11 testículos imaturos com largura variando entre 0,7 e 2,1 cm o comprimento total do animal foi de 68 e 145 cm, 3 testículos em maturação com largura variando entre 2,0 e 3,0 cm o animal variando entre 168 e 180 cm e também 3 testículos maduros variando sua largura entre 3,4 e 4,6 cm e o comprimento total do animal entre 191 e 205 cm.

Já para o tubarão galha branca oceânico (*Carcharhinus longimanus*), foram identificados 73 testículos imaturos com largura variando 0,7 e 2,5 cm, já o animal variava o comprimento total 76,2 e 100 cm, 7 testículos em maturação com largura variando entre 3,0 e 3,6 cm e o animal variando o comprimento total entre 110 e 128 cm e 15 maduros com largura variando entre 4,0 e 5,6 cm e o animal com comprimento total variando entre 155 e 202 cm.

### **Descrição Microscópica dos testículos**

A caracterização microscópica confirmou cada estágio macroscopicamente analisado, demonstrando o desenvolvimento celular, e para cada indivíduo foi observada a presença das

primeiras células principais, evidenciando o seu desenvolvimento celular ao longo da espermatogênese. Para as três espécies estudadas o desenvolvimento celular é igual.

O testículo classificado microscopicamente como imaturo mostrou a presença das espermatogônias em maior escala, (Fig. 3 A). Seguindo a escala maturacional, foi observado em toda lâmina a presença de espermatócitos e espermatídes nos testículos em maturação (Fig. 3 B e C). Os testículos maduros apresentaram-se ricos em espermatozóides, evidenciando também as células de Sertoli (Fig. 4 D). Nesse estágio, foi evidenciada posição dos espermatozóides nos túbulos, suas cabeças para a membrana basal e suas caudas para o lumen (Fig. 4 D e F).

Na observação da morfologia do testículo imaturo do tubarão *Carcharhinus falciformis*, foi evidenciado a presença do órgão epigonal, ocupando grande parte do aparelho reprodutor dos machos (Fig. 4 A e B), porém as outras duas espécies (*I. oxyrinchus* e o *C. longimanus*) também, no estágio imaturo, se mostraram da mesma forma.

O tipo de testículo encontrado no *Isurus oxyrinchus* é Radial, apresentando a zona germinativa no centro do desenvolvimento dos túbulos seminíferos se estendendo para a periferia, onde os ductos eferentes coletam os espermatozóides à medida que amadurecem (Fig. 3 E).

Para os *Carcharhinus longimanus* e *C. falciformis*, o desenvolvimento dos túbulos seminíferos segue da parede do diâmetro dos testículos para a parede oposta, onde ductos eferentes recolhem os espermatozóides. Esta classificação, também conhecida como diamétrica (Fig 4 D).

Os três espécimes estudados apresentaram uma túnica albugínea constituída de tecido conjuntivo denso, com o estroma testicular formado por tecido conjuntivo frouxo (Fig.4 E e F).

#### 4. Discussão

Stehmann (2002), em trabalho realizado com espécies ovíparas e vivíparas placentárias e aplacentárias de tubarões raias e holocéfalos, determinou estágios macroscópicos igualmente encontrados no presente trabalho como descrito abaixo: Imaturos ou Juvenis, apresentando Claspers flexíveis e pequenos, testículos pequenos e esbranquiçados com ducto espermático em linha reta. Em maturação ou Sub-adulto (adolescente) os Cláspers se caracterizam longos, semi calcificado, ultrapassando o comprimento da nadadeira pélvica. Testículos mais largos e dutos espermáticos começando a aumentar. Maduro ou Adulto-Clasper grande e rígido, testículo bem largo e arredondado, muitas vezes de coloração avermelhada e preenchido de fluido espermático. Esta classificação foi devidamente a mesma encontrada nas três espécies estudadas.

Para a análise do desenvolvimento celular nos diversos estágios maturacionais encontrado nas três espécies estudadas caracterizou a mesma história de vida celular masculina descrita por Roosen-Runge (1977). O trabalho desenvolvido pelo autor mostra que a espermatogênese compreende a história de vida de uma célula germinal masculina através de uma série de fases (gonocitos, espermatogonias, espermatócitos, espermatídes, espermatozóides) e uma seqüência definida de complexos eventos celulares, a proliferação mitótica; apoptose; meiose (o evento central da espermatogênese), e espermiogênese.

De um ângulo um pouco distinto, Teshima (1981) divide o processo da espermatogênese em duas fases: 1) a primeira seria a espermiocitogênese, onde as células espermatogênicas sofrem processo de divisão até espermatídes; 2) enquanto o segundo estágio seria a espermiogênese, onde a espermatíde sofre um processo de transformação para espermatozóide, não ocorrendo nenhuma divisão.

Segundo Stanley (1966); Dodd, (1983); Parsons e Grier, 1992; Carrier *et al*, 2004; Hamlett *et al*. 2007 e Mellinger 1965, descreve que a unidade funcional do testículo como

espermatocisto, uma estrutura esférica que contém muitos espermatoblastos compostos por células de Sertoli e células germinativas associadas.

Stanley (1966), em estudo sobre testículos de elasmobrânquios demonstraram uma relação especial entre a célula de Sertoli e as células germinativas, da mesma forma que encontramos nos testículos maduros a associação das mesmas. Esta visualização foi bem evidente nos testículos do *Isurus oxyrinchus*

Para a análise da posição dos espermatozoides nos túbulos seminíferos, assim como Metten (1939) que trabalhou com *Scylliorhinus canucula*, os resultados apresentados indicaram que a cabeça e cauda do espermatozoide tem forma de espiral, confirmando a mesma posição para espécies: (*Mustelus manazo* e *M. gruseus*, *Ceterhinus maximus*, *Cacharhinus dussumieri*, *Galeorhinus japonicus* and *Rhinobatus schlegeli*). Diferindo de Metten, Moore (1895), identificou que as cabeças dos espermatozoides no (*Scyllium canícula* e *S. catulua*) não são em forma de espiral e sim, tem forma de linha reta.

Corroborando com o estudo presente, Pratt (1988) e Carrier *et al* (2004), classificou os testículos em maturação das espécies de Laminiformes, apresentou o mesmo tipo radial, com zona germinativa no centro do desenvolvimento dos folículos seminíferos, encontrado no *Isurus oxyrinchus* que é uma espécie representante da família Laminiformes.

Da mesma maneira os testículos das espécies *Carcharhinus falciformis* e *Carcharhinus longimanus* foi observado uma outra disposição, a mesma surgida por Pratt (1988), que evidenciou nos seus trabalhos que para as famílias de *Carcharhinidae* e *Sphyrnidae* os testículos são denominados como diamétrico.

## 5. Conclusão

A análise macroscópica dos testículos apontou três estágios maturacionais distintos, os estágios iniciais e intermediários caracterizando indivíduos jovens; e os estágios finais ou avançados, os indivíduos adultos, variando ainda esse desenvolvimento de acordo com a espécie.

A análise microscópica confirmou que no estágio I foi caracterizado pela presença do órgão epigonal que nessa fase é indiferenciado do testículo, apresentando assim a mesma constituição histológica. No estágio II há uma diminuição do órgão epigonal e a diferenciação do testículo com o surgimento das primeiras células germinativas (espermatogônias). No estágio III o órgão epigonal se apresenta apenas como uma fina camada revestindo o testículo, que se encontra bastante desenvolvido com presença de túbulos seminíferos grandes e com grande quantidade de espermatozóides.

A única diferença observada na análise microscópica para as três espécies estudadas, foi na forma do testículo que para o *Isurus* se apresentou com Radial e para os *Carcharhinus* com diamétrico.

## 6. Agradecimentos

A MPA que financiou o Projeto Tubarões Oceânicos do Brasil. À FACEPE pela bolsa de mestrado da autora Mariana Gomes do Rêgo e aos observadores de bordo pelo apoio na obtenção das amostras.

## 7. Referências

Beçak, W.; Paulete, J. 1976. Técnicas de Citologia e Histologia. V. 1. 305p. Rio de Janeiro.

Behmer, A.; Castro de Tolosa, E. M.; Neto, A. G. F. 1976. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo / Departamento de Cirurgia, 255p. São Paulo.

- Carrier, J. C., Pratt JR, H. L. and Castro, J. I. 2004. Elasmobranch Reproduction. Pp.269-286. In J. C. Carrier, J. A. Musick and M. R. Heithaus (eds), *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, LLC. Boca Raton.
- Dodd, J. M. 1983. Reproduction in cartilaginous fishes (Chondrichthyes), in *Fish Physiology*, Vol. 9A. W. S. Hoar, D. J. Randall, and E. M. Donaldson, Eds., Academic Press, New York.
- Hamlett, W. C. 2007. Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids, and chimaeras. Vol. 3. pp.171- 200.
- Junqueira, L. C.; Junqueira, L. M. M. S. 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. Livraria e editora Santos, 123p. São Paulo.
- Metten, H. 1939. Studies on the reproduction of the dogfish, *Phil. Trans. Roy. Soc. London. Series B*, 230:217-238.
- Moore, J.E.S. 1985. ON the structural change in the reproductive cells during the spermatogenesis of elasmobranchs. *Quart. J. Micr. Sci.*,38:275-313.
- Mellinger, J. 1965. Stades de la spermatogenesechez *Scyliorhinus caniculus*: description, données histochimiques, variations normales et expérimentales. *Zeitschrift für Zellforschung* 67: 653-673.
- Parsons, G. R. and H. J. Grier. 1992. Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. *J. Exp. Zool.* 261:173–184.
- Pratt, H. L. 1988. Elasmobranch gonad structure a description and survey. *Copeia* 1988:719–729.
- Roosen-runge, E. 1977. *The process of spermatogenesis in animals*. Cambridge university. Press 1-214 PP.
- Stehmann, M. F. W. 2002. Proposal of a mature stages scale for oviparous and viviparous cartilaginous fishes (Pisces, Chondrichthyes). *Arquive of Fishery and Marine Research. Res.* 50 (1), 23-48.

Stanley, H. P. 1966. The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). *Z. Zellforsch.* 75:453–468.

Teshima, K. 1981. Studies on the reproduction of Japanese dogfishes, *Mustelus manazo* and *M. griseus*. *J. Shimonoseki Univ. Fish.* 29:113-199.

Wourms, J. P. 1977. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *Am. Zool.* 17:379–410.

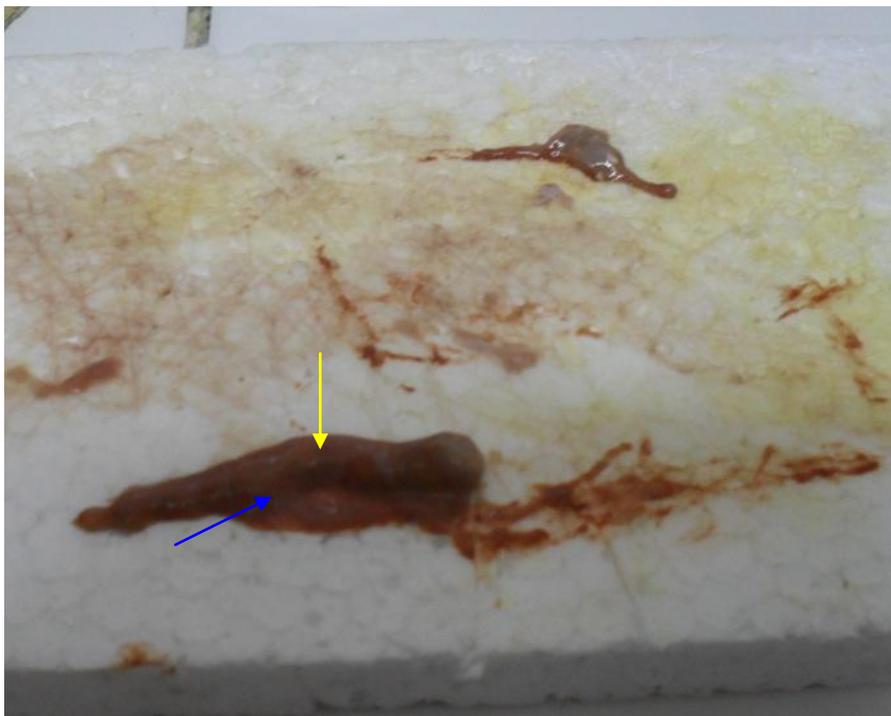


Fig. 1. Foto do testículo imaturo do Tubarão *Cacharhinus longimanus*, evidenciando o testículo (seta amarela) e o órgão epigonal (seta azul)



Fig. 2. Foto do testículo maduro do Tubarão *Isurus oxyrinchus* (seta amarela).

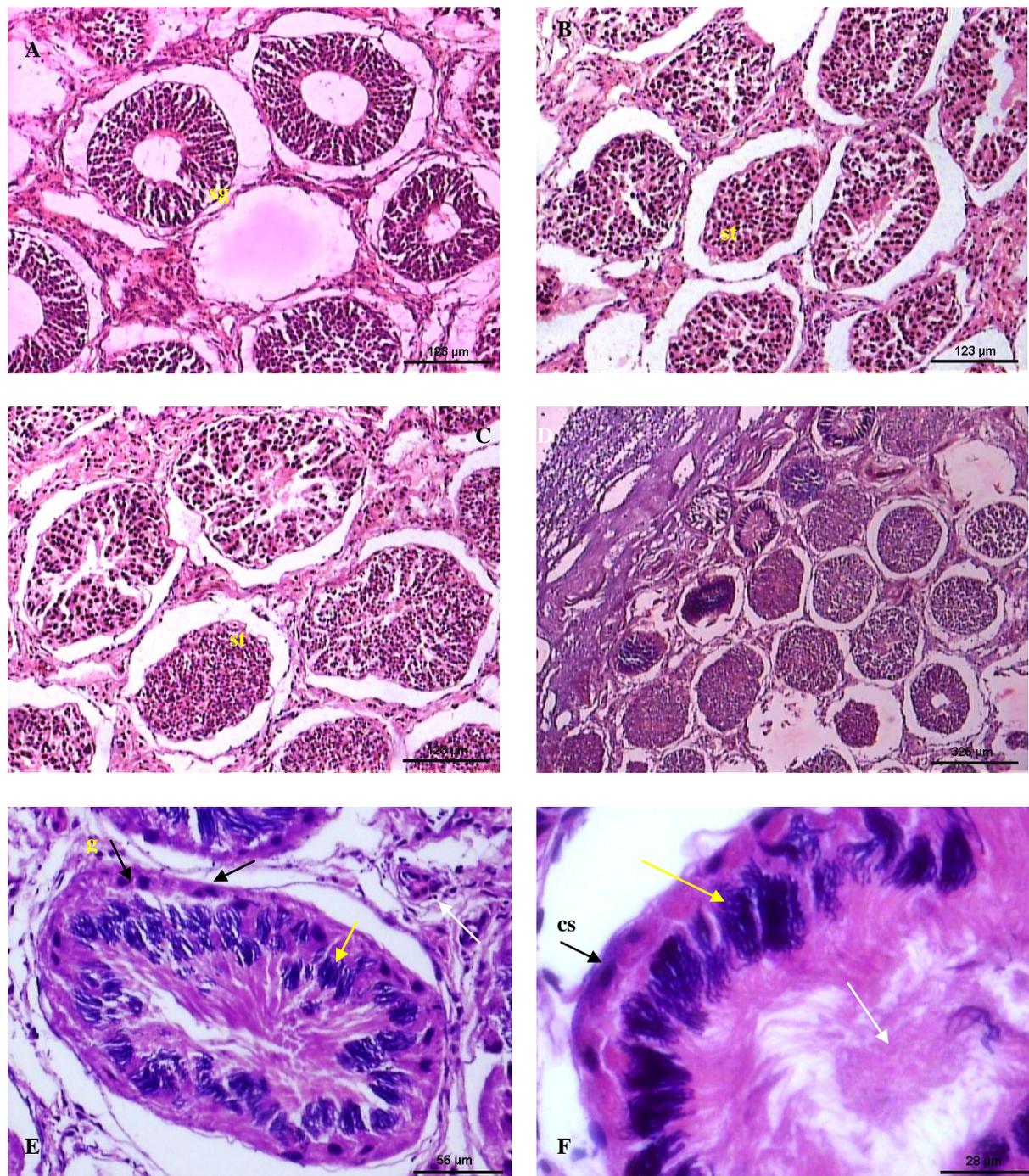


Figura 3. Fotomicrografia de Testículo do Tubarão Mako (*Isurus oxyrinchus*): A – Espermatogônias (sg). coloração: H.E ; B – Espermatócitos (sc). Coloração: H.E; C – Espermátides (st). coloração: H.E; D testículo em maturação, caracterizando tipo de testículo Radial, coloração: H.E –E- espermatozóide maduro (ms) com presença das gônias (g), Células de Leydig's (seta branca) e cabeça da espermatozóide (seta amarela) e cauda para o lumem (seta branca) Coloração: H.E e F– Célula de Sertoli (cs), Cabeça da espermatozóide (seta amarela) e cauda para o lumem (seta branca) coloração: H.E.

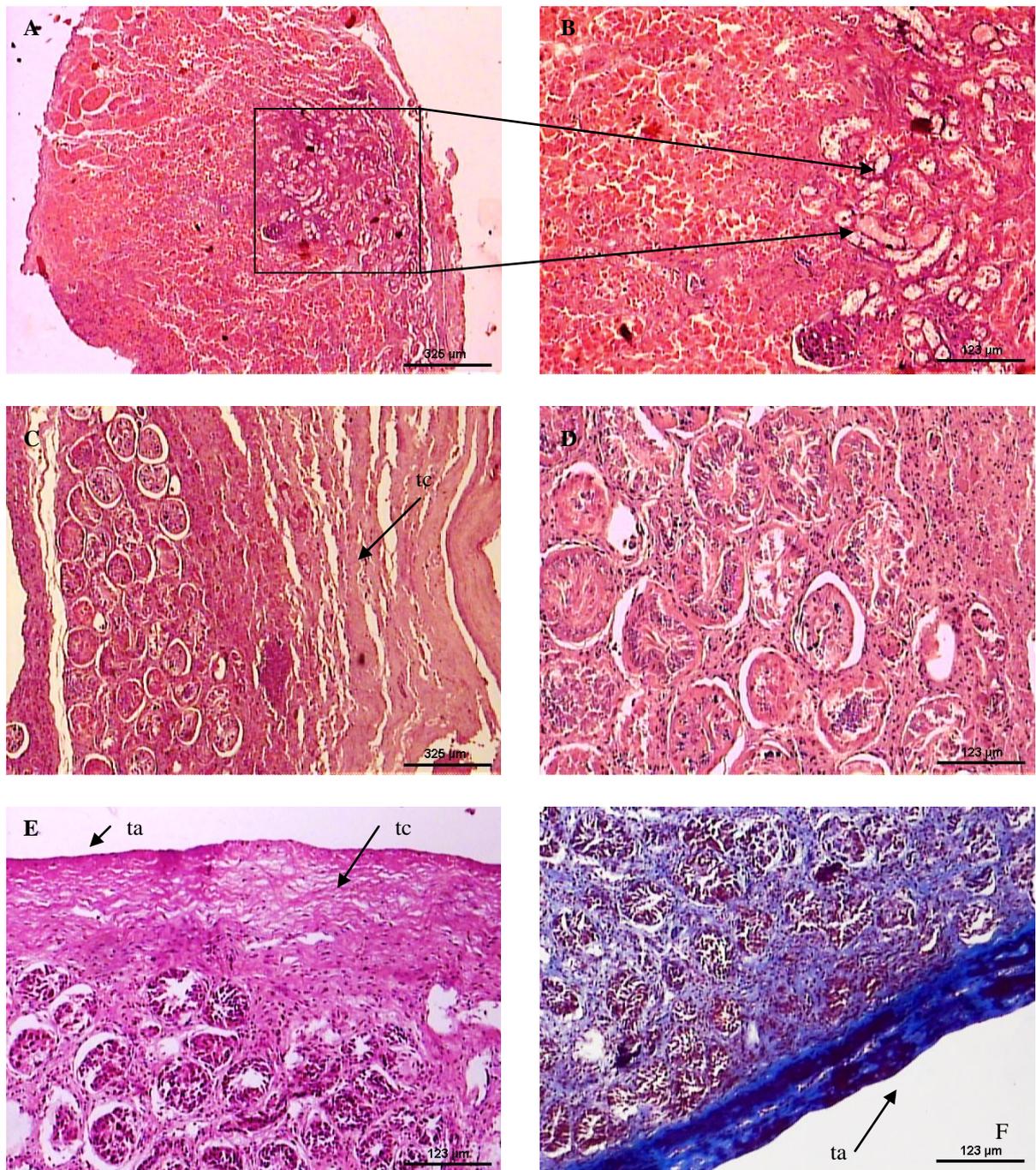


Figura 4. Fotomicrografia de Testículo do Tubarão Lombo Preto (*Carcharhinus falciformis*) letras de A a D e Tubarão Galha Branca Oceânico (*Carcharhinus longimanus*) letras E e F: A – Testículo imaturo, evidenciando órgão epigonal, coloração: H.E; B – aumento da foto A evidenciando o início da formação, coloração: H.E, C – Testículo em desenvolvimento, presença do tecido conjuntivo (tc), coloração: H.E D – Testículo em maturação, coloração: H.E e E e F– Testículo em maturação evidenciando a túnica albugínea (ta) e o tecido conjuntivo (tc), coloração: H.E e Tricrômico de Gomori.