

MARIANA GOMES DO RÊGO

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO APARELHO
REPRODUTOR DE TUBARÕES CAPTURADOS
NO NORDESTE BRASILEIRO.**

**RECIFE
2014**



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

MARIANA GOMES DO RÊGO

ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO APARELHO REPRODUTOR DE TUBARÕES CAPTURADOS NO NORDESTE BRASILEIRO

Tese 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 Doutorado em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

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

**RECIFE
2014**



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

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO APARELHO REPRODUTOR DE
TUBARÕES CAPTURADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

Tese de Doutorado elaborada por

MARIANA GOMES DO RÊGO

Aprovada em 11 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto - Presidente
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dr. Fábio Hissa Vieira Hazin
Departamento de Pesca e Aquicultura - UFRPE

Prof. Dr. Paulo Guilherme V. de Oliveira
Departamento de Pesca e Aquicultura – UFRPE

Prof. Dra. Maria Lúcia Goes de Araujo
Departamento de Pesca e Aquicultura - UFRPE

Prof. Dra. Liriane Baratella Evêncio
Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE

Recife, 2014.

*Dedico aos tripulantes da embarcação
Horizonte II, especialmente a Rivaldo
Segundo e Flavinho (in memoriam) e aos
pescadores da praia do Mucuripe.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus e minha Mãe, pois sem ela não seríamos nada. A minha pequena, ANALU, meu irmão, meu sobrinho lindo (Matheus), minha sobrinha (Sophie), Suzi, meu Pai e toda a família Rêgo.

A minha nova família, que me recebeu maravilhosamente nesses 2 últimos anos, Ivana Meneses, Luana Meneses, Lucas Silveira, Ivo, Ivaldo e Denise Meneses obrigada pelo apoio e pelo carinho. E em especial a Leonardo Silveira, que não só foi meu braço direito nas coletas como não me abandonou em momento nenhum nesse período difícil, obrigada por tudo Amo você!

Ao meu Orientador, Joaquim Evêncio Neto, pelo apoio e por me ouvir e me aconselhar nos momentos de TPT (tensão pré-tese) e por me ajudar a crescer na vida acadêmica, afinal foram 6 anos de convivência, Obrigada

Ao Prof. Dr. Fabio Hazin, um grande amigo que em 12 anos de convivência, me ensinou a sempre olhar o mundo de duas maneiras, Obrigada Fabinho por tudo e pelas oportunidades nesta vida e principalmente por me dá o meu “PRESENTE PRECIOSO”.

Ao Prof. Dr. Paulo Oliveira, um verdadeiro irmão, sem palavras para descrever o que sinto por esse grande Ser Humano!

Ao Prof. Dr. John Fitzpratick, pela ajuda, carinho e apoio na Universidade de Manchester, Thank you for the oportunit.

A todos os amigos que fiz na Universidade de Manchester, Dr. Shaid Khudr, Margherita Scarcia, Elis Damacedo, Cepherino, Cecilia Medupin, Emma Randle, Hugo Benítez, Carolina Bustos, Felipe Melo-González, Dany Lopez, Sarah Griffiths, Alicia bertolotti, Friederike Clever, Lina Barrios e Prof. Dr.

Rirchard Preziosi (Thanks for the support and kindness during the months I spent with you).

As minhas amigas e irmãs (Sisters and roommates) Lilian Maina and Ireny Iskander, obrigada pelos jantares e conversas na cozinha (Thanks for the dinners and long conversations in the kitchen).

As minhas amigas Tatiane Souza, Patrícia Pinheiro, Alessandra Fisher, Daniele Viana, Raquel Lucchesi, por tudo que vivemos durante todos esses períodos de transição de estagiária, mestranda e doutoranda, amo vocês.

A minha amiga Maria Lucia Araújo, obrigada por ser uma luz no meu caminho, tenho uma gratidão imensa por tudo que fizestes.

As minhas grandes amigas histológicas, Maria Edna Barros, Renata Felix, Priscila Rocha e Ana Lízia, pelo apoio, amizade de conversas eternas sobre como sobreviver no doutorado, vocês moram no meu coração.

A todos do laboratório de Histologia, Joca Macêdo, Jaciel Oliveira, José Neto, Fernanda Barbosa, Daniele Dutra, Wanessa Noadya, Jessica Lima, Priscila Oliveira, Fabiana Felix, Antônio Pedro, Lígia Estevão, Yuri Albuquerque, Raquel, Marcela Vieira, Brena Pessoa, Fábio Mendonça e José de Castro, obrigada pela força.

Um obrigada a duas amigas que hoje não fazem mais parte do grupo, Maria Goretti Soares e Keila Regina, obrigada sempre.

Aos amigos do LOP/LEP/LATEP: muito obrigada por estarem comigo nessa longa jornada.

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

A secretária mais simpática da UFRPE, Edna Cherias, a você um agradecimento enorme, Obrigada minha amiga.

Aos amigos Jones Santander, Rodrigo Barreto e Ana Rita que sempre trocávamos ideias acerca da vida e da tese, Valeu!

Aos Professores Do Programa de Biociência Animal em especial ao Professor Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior e Professor Dr. Fabrício Bezerra de Sá, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia animal (DMFA) que sempre receberam a gente com muito carinho.

As meninas da Copa, tanto da Pesca quanto do DMFA: Dona Eliane, Dona Zena, Socorro, Vani, Marisa e Rejane, sempre fazendo nosso café e sempre sorrindo, mesmo quando a gente chegava atacada, Obrigada meninas vocês são demais!

Às minhas amadas, sempre, longe ou perto, sempre serão AmadaS eternamente AMO!

Aos amigos e companheiros da academia e do boxe, Suzy, Camila Melo, Paula, Cibelle, Yone, Lucas, Vini, Luciano, Micheline, Toninho e Janaina! Obrigada por todos os dias fazerem o meu estresse ir embora.

E em especial aos grandes amigos que fiz no meio do grande Oceano Azul, um enorme obrigada a ajuda nas coletas e pelo carinho, meus grandes amigos pescadores de ilusão: Faca layzer, GIGI, Sr. Claudio, Salsicha, Netinho, Chico e todos os outros.

RESUMO

Os elasmobrânquios apresentam estratégias reprodutivas complexas, com duas formas de reprodução quanto ao desenvolvimento embrionário, são elas a oviparidade e viviparidade. As formas menos complexas ou mais simples de viviparidade são: lecitotrófica e ovofágica. As formas mais evoluídas são: placentotrófica e trofodermia/histotrofia (toda viviparidade é uterina) que são também conhecidas por viviparidade matrotrofica. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo histológico, para detalhar a morfologia do aparelho reprodutor de espécies de tubarões costeiros e pelágicos, capturadas no nordeste brasileiro. Para este estudo foram utilizados fêmeas e machos do tubarão com modo de reprodução lecitotrófico, *Ginglymostoma cirratum*, machos das espécies de tubarões matotróficos *Prionace glauca*, *Rhizoprionodon lalandii* e *Mustelus canis*. O tubarão lixa *G. cirratum* apresentou características morfológicas únicas no aparelho reprodutor de ambos os sexos. Histologicamente, os ovários são separados do estroma e do órgão epigonal por uma camada de tecido conjuntivo, que se ramifica, formando septos incompletos, e dividindo a região cortical do ovário em lóbulos com lotes ovígeros distintos. A inferência de que a formação de grupos específicos de ovócitos é a melhor estratégia para perpetuação da espécie, deve ser melhor investigada em *G. cirratum*. No útero do tubarão lixa foi possível observar as camadas: mucosa, muscular e serosa. A camada mucosa da fêmea em desenvolvimento apresentou epitélio uterino com presença de vascularização, o que pode indicar que nas fêmeas grávidas, a mucosa uterina auxilia na homeostase do embrião durante a gestação. Um estudo mais amplo envolvendo todos os estágios maturacionais de *G. cirratum* poderia elucidar de forma mais significativa o processo da especialização da mucosa uterina, e a influência desta no desenvolvimento do embrião. Todo o processo da espermatogênese ocorre dentro de cistos. Os testículos são do tipo radial e possuem um desenvolvimento da região caudal para a região cranial. Este padrão de desenvolvimento testicular não é compartilhado por outras espécies de elasmobrânquios, e este caso parece ser único entre as espécies de tubarão. Os tubarões *P. glauca*, *R. lalandii* e *M. canis*, possuem o tipo de testículo diamétrico, com desenvolvimento da porção cranial para a porção

caudal. Em *M. canis* não foram observadas todas as células da linhagem espermatogênica em animais nos primeiros estágios de maturação. Nas espécies *P. glauca* e *R. lalandii* foram observadas diferenças significativas no diâmetro do cisto (ANOVA $F = 10,422$; $p = 0,00145$) e nos números de células de Sertoli ($p = 0,026$ ANOVA $F = 4,979$). O número de células Sertoli foi estatisticamente diferente nos cistos espermatogênicos, ao longo da espermatogênese de *P. glauca* (KW, $H = 28,62$, $p = 0,000$) e *R. lalandii* (KW, $H = 58,289$, $p = 0,000$). O aumento do diâmetro celular do espermatócito II na espécie *R. lalandii*, observado neste estudo, é contrário a tendência do observado para o grupo de vertebrados, inclusive das espécies de elasmobrânquios, como *P. glauca*. O significado funcional desta anomalia celular, abre um campo para investigações futuras sobre a espermatogênese deste pequeno tubarão costeiro, usando citoquímica.

Palavras-chave: Elasmobrânquios; Reprodução; Histologia

ABSTRACT

Elasmobranchs have complex reproductive strategies, which contain two reproductive forms of embryonic development; they are oviparity and viviparity. Less complex or simpler forms of viviparity are: lecithotrophic and oophagy. The most evolved forms are: placentotrophic and trofodermia/histotrophy (all viviparity is uterine) also known as matrotrophic viviparity. The objective of this study was to obtain a histological study, in order to closely define the morphology of the reproductive system of the coastal and pelagic shark species caught in northeastern Brazil. For this study, both female and male sharks with the lecithotrophic reproduction mode were used, *Ginglymostoma cirratum*, matrotrophic male shark species, *Prionace glauca*, *Rhizoprionodon lalandii* and *Mustelus canis*. The Nurse shark, *G. cirratum* presented unique morphological characteristics of the reproductive system of both sexes. Histologically, the ovaries were separated from stromal and epigonal body by a layer of connective tissue, which branches forming an incomplete septa dividing the cortical region of the ovarian lobes into different ovigerous batches. This inference of the formation of specific oocytes groups, illustrates that it is the best strategy for the perpetuation of the species, which should be further investigated in *G. cirratum*. In the nurse shark's utero the different layers were observed: mucosa, muscular and serosa. In the mucous layer of the developing female the presence of vascularization was found in the uterine epithelium, which may indicate that in pregnant females the uterine lining assists in homeostasis during the embryo gestation. A better study involving all maturational stages of *G. cirratum* could elucidate more significantly the specialization process of the uterine lining, and the influence in the developing embryo. The entire process of spermatogenesis occurs within cysts. The testicles are in radial form and have a caudal to cranial development. This testicular development pattern is not shared by other elasmobranch species, and this case seems to be unique among the shark species. The sharks, *P. glauca*, *R. lalandii* and *M. canis*, have diametric testis with the cranial to caudal development. In *M. canis* not all the spermatogenic lineage cells were observed in animals in the early stages of maturation. In species *P. glauca* and *R. lalandii* significant differences were observed in the diameter of the cyst (ANOVA $F = 10.422$, $p = 0.00145$) and in the number of Sertoli cells ($p = 0.026$ ANOVA $F = 4.979$). The number of Sertoli cells was statistically different in spermatogenic cysts throughout spermatogenesis of *P. glauca* (KW, $H = 28.62$, $p = 0.000$) and *R. lalandii* (KW, $H = 58.289$, $p = 0.000$). The increase in cell diameter of spermatocyte II in the *R. lalandii* species, observed in this study, is contrary to the trend observed for the vertebrate group, including elasmobranch species, such as *P. glauca*. The functional significance of this cell anomaly opens a field

for future research on the spermatogenesis of this small coastal shark, using immunocytochemistry.

Keywords: Elasmobranchs; Reproduction; Histology

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Descrição das espécies	13
2.1.1. <i>Ginglymostoma cirratum</i>	13
2.1.2. <i>Rhizoprionodon lalandii</i>	14
2.1.3. <i>Prionace glauca</i>	15
2.1.4. <i>Mustelus canis</i>	16
2.2. Estratégias reprodutivas	16
2.3. O Aparelho reprodutor feminino	18
2.4. O Aparelho reprodutor masculino	21
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL	27
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
5. REFERÊNCIAS	32
1º artigo- Descrição morfológica do ovário e útero de tubarão lixa (<i>Ginglymostoma cirratum</i> , Bonaterre, 1778) capturados na praia de Mucuripe, Fortaleza-CE.	37
Resumo	37
Introdução	48
Material e métodos	39
Resultados	40
Discussão	43
Referências	46
2º artigo- Caracterização morfológica e espermatogênica do testículo do tubarão lixa <i>Ginglymostoma cirratum</i> (Bonaterre, 1778)	54
Resumo	54
1 Introdução	56
2. Material e métodos	58
Resultados	59
Discussão	62
Agradecimento	64
Referências	64
3º artigo- A comparação da morfologia e histomorfométrica de cisto espermatogênico de três espécies de tubarões com testículos diamétricos	72
Resumo	72
1 Introdução	74

2. Material e métodos	75
Resultados	77
Discussão	81
Agradecimento	84
Referências	84

INTRODUÇÃO

A Classe Chondrichthyes engloba 3 tipos diferentes de peixes cartilaginosos: os tubarões, as raias e as quimeras. As quimeras (Subclasse Holocephalii) provavelmente derivaram de um tubarão pré-histórico após o Período Carbonífero, assim como as primeiras raias, que surgiram no Triássico (PAXTON e ESCHMEYER, 1994), como uma adaptação à vida demersal. Além de seu esqueleto característico, os peixes cartilaginosos diferenciam-se bastante dos peixes ósseos, inclusive por possuírem escamas placóides (conhecida como dentículos dérmicos), em lugar de escamas ciclóides e ctenóides, típicas dos primeiros, e dentes que podem ser repostos na medida em que se perdem (CLEAVE, 1994; NELSON, 1994; BANNISTER, 1996; GADIG, 1998a).

Os tubarões, particularmente, são um grupo com grande sucesso evolutivo, compreendendo mais de 400 espécies, agrupadas em oito ordens, que adotaram distintas histórias de vida, explorando diversos nichos no ambiente aquático (COMPAGNO, 1990). São encontrados no mundo inteiro em todos os ambientes marinhos, desde águas rasas próximas à costa até profundidades além dos 2.000 m, havendo também espécies de água doce como o *Glyphis gangeticus*. Existem tubarões cuja distribuição é exclusivamente oceânica, outros que são estritamente costeiros e por último os que se movem nesses dois ambientes. Seus poderosos e bem integrados órgãos sensitivos, sua eficiente capacidade natatória, os seus avançados modos reprodutivos e seus diversos mecanismos de alimentação tornaram-nos altamente competitivos quando comparados aos tetrapoda marinhos e aos peixes ósseos, aspecto que poderia explicar o fato dos mesmos não terem declinado com o surgimento de outros animais na história evolutiva (COMPAGNO, 1990).

A mais significativa das adaptações dos peixes cartilaginosos, porém, é certamente a sua fertilização interna e a produção de embriões, que já nascem plenamente desenvolvidos e ativos, de forma similar aos adultos. Para as espécies que são vivíparas, os embriões passam seus estágios de desenvolvimento dentro do corpo de sua mãe, recebendo, assim, proteção durante suas fases mais vulneráveis, com os neonatos nascendo com tamanho

relativamente grande, reduzindo o número de potenciais predadores e concorrentes (CASTRO, 1983).

Outro aspecto importante da biologia dos elasmobrânquios é a sua diversidade de modos reprodutivos, que podem ser classificados, quanto ao desenvolvimento do embrião, em oviparidade e viviparidade, dentro dos quais são descritas várias modalidades. A viviparidade está presente em 56% dos Chondrichthyes, sendo mais comum nos tubarões, enquanto a oviparidade (44%) é mais comum entre as raias. As formas mais ancestrais de viviparidade são a lecitotrófica e a ovofágica, enquanto as formas mais evoluídas derivadas são a placentotrófica e a histotrófica, também conhecidas por viviparidade matotrófica, no qual a ligação entre a mãe e o embrião é maior (DODD, 1983; CARRIER; PRATT, JR; CASTRO, 2004; HAMLETT, 2007).

A correlação entre os modos de reprodução e a morfofisiologia dos órgãos reprodutores dos elasmobrânquios passou a ser melhor compreendida a partir dos trabalhos de Pratt (1988), que classificou os ovários em internos e externos e os testículos em diamétrico, radial e composto; e de Hamlett (1998), que relacionou a morfologia uterina com o tipo de reprodução; além de trabalhos mais específicos de caracterização da espermatogênese efetuados por Stanley (1966), Teshima (1988) e Maruska, et al. (1996).

Nesse contexto, este trabalho visa a estudar a morfologia do aparelho reprodutor de quatro espécies vivíparas de tubarão (*Ginglymostoma cirratum*, *Rhizoprionodon lalandii*, *Prionace glauca* e *Mustelus canis*), em relação às quais muito pouco ainda se conhece, comparando os seus aspectos morfológicos com o modo reprodutivo da espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Descrição das espécies

2.1.1. *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788)

Os tubarões lixa pertencem à ordem Orectolobiforme, família Ginglymostomatidae, possuem comprimento total máximo de 400 cm, são vivíparos lecitotróficos, com um período de gestação de aproximadamente 5 meses, e apresentam um tamanho de nascimento estimado em torno de 27-

30 cm de comprimento total (COMPAGNO, 2005). O *G. cirratum* estão listados como Vulneráveis no Brasil (IUCN, 2012), encontrando-se, conseqüentemente, incluídos na Lista Oficial de Animais em extinção (IN05/2004 MMA).



Fig. 1. Tubarão *Ginglymostoma cirratum*. Fonte: Mariana Rêgo

2.1.2. *Rhizoprionodon lalandii* (Muller and Henle, 1839)

Os tubarões rabo-seco pertencem à ordem Carcharhiniforme e à família Carcharhinidae, possuem comprimento total máximo 110 cm, são vivíparos placentários, com um período gestacional de aproximadamente 10 a 11 meses, podendo ter uma média de 2 a 6 filhotes por gestação (COMPAGNO, 2005; MOTTA, 2005).



Fig. 2. Tubarão *Rhizoprionodon lalandii*. Fonte: Mariana Rêgo

2.1.3. *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758)

Os tubarões azul também pertencem à ordem Carcharhiniforme, família Carcharhinidae, possuem comprimento total máximo de 400 cm, são vivíparos placentários, com um período de gestação variando de 9 a 12 meses, e têm aproximadamente 15 a 30 filhotes por ninhada (COMPAGNO, 2005).



Fig. 3. Tubarão *Prionace glauca*. Fonte: Mariana Rêgo

2.1.4. *Mustelus canis* (Mitchill, 1815)

Os tubarões boca de velha também pertencem à ordem Carcharhiniforme, família Triakidae, possuem comprimento total máximo de 150 cm, são vivíparos placentários, com um período de gestação de 10 meses, e têm aproximadamente 4 a 20 filhotes por ninhada (COMPAGNO, 2005).



Fig. 4. Tubarão *Mustelus canis*. Fonte: Mariana Rêgo

2.2. Estratégias reprodutivas

Apesar de todos os elasmobrânquios apresentarem fertilização interna, os modos de reprodução são bastante variados (COMPAGNO, 1990; JOUNG et al., 1996), incluindo oviparidade, viviparidade aplacentária e viviparidade placentária (WOURMS, 1977). A viviparidade é o modo de reprodução dominante entre os peixes cartilaginosos, presente em cerca de 515 espécies (56%). Em contra-partida, somente 2 a 3% dos peixes ósseos possuem esse modo de reprodução. A viviparidade é também mais frequente entre os tubarões (70%) do que entre as raias, cuja maioria é ovípara (WOURMS; LOMBARDI, 1992).

Espécies vivíparas, tem como principal característica reter no útero os embriões, durante todo o período de desenvolvimento (BUDKER, 1958). Este modo reprodutivo se divide em lecitotrófico ou matotrófico. O desenvolvimento lecitotrófico ocorre quando os embriões se alimentam por meio dos seus sacos vitelínicos, embora esse modo de desenvolvimento também ocorra em algumas espécies placentárias. Já o desenvolvimento matotrófico ocorre quando os embriões recebem nutrientes derivados tanto do saco vitelínico como das trocas com a mãe durante a gestação, podendo ocorrer tanto para espécies vivíparas aplacentárias como placentárias (WOURMS; LOMBARDI, 1992).

Em 1988, Wourms et al. classificaram os modos reprodutivos dos elasmobrânquios em cinco tipos genéricos: oviparidade, viviparidade lecitotrófica (*i.e.* os embriões dependem unicamente das reservas vitelínicas, *e.g.* tubarão lixa, *Ginglymostoma curratum*), e viviparidade matotrófica, subdividida em ovofagia (comem os ovos) ou adelfofagia (canibalismo intrauterino; *e.g.* tubarão mangona, *Carcharias taurus*), trofodermia e placentotrofia (*i.e.* alimentados através da placenta, *e.g.* tubarão azul, *Prionace glauca*).

Nas espécies ovíparas, os embriões se desenvolvem dentro de uma cápsula que é depositada no ambiente. Compagno (1990) sugere que os elasmobrânquios selecionam substratos apropriados para deposição dos seus ovos, onde os embriões vão se desenvolver fora da mãe. O desenvolvimento dos embriões pode durar por diferentes períodos, indo desde 2 mês até perto de um ano (COMPAGNO, 1990). Embriões ovíparos tendem a ser relativamente menores do que os embriões vivíparos, devido a limitação da quantidade de vitelo inicialmente presente no saco vitelínico (HAMLETT, 1997).

Vários grupos de elasmobrânquios apresentam viviparidade lecitotrófica, *i.e.* são “vitelo-dependentes”, incluindo os Squaliformes, os Hexanchiformes, os Squatinaformes, alguns Orectolobiformes e alguns Carcharhiniformes, além de alguns grupos de raias. Nesse modo reprodutivo os embriões são retidos nos úteros não somente para proteção, mas para osmorregulação e trocas gasosas, embora não recebam nenhum suplemento nutritivo da mãe durante a gestação. Consequentemente, os neonatos são relativamente pequenos ao nascerem (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004).

No caso dos elasmobrânquios com modo de reprodução ovofágico, o ovário possui um grande crescimento, muitas vezes pesando mais de 5 kg (GILMORE et al., 1983; GILMORE, 1993), apresentando ovos pequenos, normalmente entre 5 a 7 mm de diâmetro, muitas vezes presentes somente no começo do desenvolvimento. Nesse modo reprodutivo, os embriões dependem do vitelo por um curto tempo, em torno de poucas semanas, passando a ingerir outros ovos no útero, quando atingem um tamanho em torno de 5 cm. Esses pequenos embriões aparentemente possuem uma pequena dentição que auxiliam a romper a cápsula dos ovos, permitindo que os mesmos ingiram somente o seu conteúdo de vitelo. Normalmente são somente alguns ovos

fertilizados que são produzidos no começo da gestação. Em alguns casos, ocorre o canibalismo intrauterino entre os embriões (adelfofagia) de forma que somente um sobrevive em cada útero. A ovofagia é característica dos Lamniformes (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; CONRATH 2004).

Na viviparidade placentária os embriões são nutridos inicialmente pela reserva de vitelo proveniente do saco vitelínico. Assim que o vitelo acaba, porém, a superfície do saco vitelino se alonga e sua superfície se dilata, tornando-se altamente vascularizada. Na sequência, o mesmo se adere à parede uterina, fundindo-se ao tecido da mãe, formando o saco vitelino placenta. Uma vez que a placenta é formada, a troca gasosa e nutritiva passa a ocorrer diretamente entre a mãe e o embrião. Os embriões de elasmobrânquios placentários têm praticamente um suprimento ilimitado de energia (HAMLETT, et al., 1985; 2007). Algumas espécies vivíparas placentárias possuem compartimentos uterinos, que são sugeridos como um importante passo para a evolução desse modo de reprodução (OTAKE, 1990).

Algumas espécies de elasmobrânquios apresentam caracteres sexuais secundários. Machos usualmente são menores do que as fêmeas e os contornos do corpo geralmente mais delgados. Entretanto, a mais importante característica sexual secundária dos machos é o seu órgão copulatório, denominado de clássper ou pterigopódio (DODD et al., 1983).

2.3. O aparelho reprodutor feminino

As fêmeas dos elasmobrânquios possuem dois ovários, que são suspensos por mesentérios na parte dianteira da cavidade do corpo, e dois ovidutos, que podem ser divididos em duas principais partes: glândula nidamentária (ou nidamental ou oviducal) e útero (DOOD, 1983). Os ovários se encontram intimamente associados ao órgão epigonal, que apresenta histologicamente sua morfologia igual para ambos os sexos (TESHIMA, 1981). Em várias espécies de elasmobrânquios apenas um ovário é funcional, normalmente o direito, com o outro se tornando vestigial, a exemplo da família Carcharhinidae (PRATT, 1988). Formas ovíparas, por sua vez, apresentam os dois ovários desenvolvidos e funcionais, a exemplo das Myliobatiformes

(DODD, 1983; LOVEJOY, 1996; HAMLETT; KOOB, 1999; CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; HAMLETT, 2007).

Os ovários são compostos por vasos sanguíneos, nervos e uma grande diversidade de folículos ovarianos e ovogônias. Embora a morfologia possa variar muito entre as espécies, a principal variação se dá pela presença ou não de ovócitos vitelogênicos (quantidades e tamanhos), a depender da estratégia reprodutiva adotada (PRATT, 1988; CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; HAMLETT, 2007).

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 folículos pequenos que variam entre 3 e 5 mm de diâmetro, para servirem como alimento na estratégia ovofágica, adotada por tubarões desta ordem. Este tipo de ovário é caracterizado como interno. Para as outras espécies o ovário é caracterizado como externo, originando-se na superfície plana do órgão epigonal ou ainda diretamente do mesovário. Este tipo de ovário produz ovócitos de tamanho relativamente grande, geralmente variando entre 20 e 60 mm de diâmetro.

A maturidade sexual feminina pode ser determinada pela avaliação das condições do trato reprodutivo, incluindo a presença ou ausência de óvulos bem desenvolvidos nos ovários, e de ovos ou embriões nos úteros (Bass et al., 1973; Snelson, 1988; Conrath, 2004).

Embora os ovários e ovidutos comecem o desenvolvimento como estruturas pares, muitas vezes as mesmas se tornam assimétricas em tubarões adultos, como em *Scyliorhinus*, *Pristiophorus*, *Cacharhinus*, *Mustelus* e *Sphyrna*, nos quais o ovário direito é funcional e o esquerdo atrofiado, embora ambos ovidutos estejam presentes (DANIEL, 1928).

A glândula nidamental secreta uma substância parecida com a albumina, além de 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 pelos espermatozóides localizados na parte superior do oviduto ou na própria glândula. Outra importante função da glândula nidamental é armazenar os espermatozóides, os

quais, em algumas espécies, podem durar meses ou mesmo anos. Posteriormente à glândula nidamental, o oviduto se alarga formando a porção denominada de 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, sendo expelidos para o meio ambiente marinho, onde se desenvolverão, comumente fixos ao substrato (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; HAMLETT, 2007).

Estudos histológicos dos ovários de diferentes espécies de Condrictes, incluindo tanto espécies ovíparas como vivíparas, mostram que folículos de diferentes tamanhos (corpora lútea) são mantidos juntos por uma rede de estroma formada por tecido conjuntivo (GIACOMINI 1896; WALLACE 1903; CHAMPY; GLEY 1923; SAMUEL 1943, 1946; BABEL 1967, DODD 1983). O córtex do ovário é composto 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).

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 (HAMLETT et al., 1999).

No processo de ovogênese em *Mustelus manazo* e *Mustelus griseus*, os ovócitos começam a se desenvolver com diâmetro entre 15 a 20 μm e são revestidos com duas a três camadas de 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).

Os ovários dos elasmobrânquios costumam apresentar, também, “corpos atrésicos” e “corpos lúteos” ou “corpora lútea”. Corpos atrésicos são folículos pós-ovulatórios em atresia, ocorrendo no ovário maduro, enquanto os “corpora lútea” são folículos pós-ovulatórios em estágios de reconstrução (WOURMS 1977, DODD, 1983).

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, que é composto por um epitélio germinativo (HAMLETT et al., 1999).

Todas as espécies, estudadas até agora, demonstraram que a zona pelúcida separa os ovócitos da parede do folículo, havendo ainda 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 mais 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. Em *Urobatis jamaicensis* (HAMLETT, 1999) e *U. halleri* (BABEL, 1967), por exemplo, as células colunares se alternam com grandes células redondas que contêm substâncias lipídicas, compreendendo a camada granulosa. Com a foliculogênese, porém, ocorre a diminuição dessas células em tamanho, desaparecendo antes da ovulação (HAMLETT et al., 1999).

2.4. O Aparelho reprodutor masculino

Os Condrictes possuem reprodução interna, ou seja, depositam o sêmen dentro do aparelho reprodutivo da fêmea. O aparelho reprodutor masculino inclui dois testículos, que são presos na parte superior dianteira da cavidade abdominal; dois epidídimos, que passam por trás e logo abaixo da coluna vertebral, na parede superior da cavidade abdominal; e órgãos copuladores chamados de pterigopódios, mixopterígios ou, mais comumente, de “clásper”, e que são, na verdade, uma modificação da margem interna da nadadeira pélvica

(DOOD, 1983; CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004). Este órgão é sustentado pelo endoesqueleto e representa uma das principais características sinapomórficas que tornam os Condrictes um grupo monofilético (GROGAN; LUND, 2004; HAMLETT ,2007). Na medida em que o animal cresce, o grau de calcificação e consequente rigidez dessa estrutura aumenta, sendo, por essa razão, utilizado como um dos critérios para determinar em que estágio maturacional o animal se encontra. Normalmente, o indivíduo é considerado adulto, e, portanto, apto à reprodução, quando o clássper apresenta sustentação cartilaginosa bem desenvolvida e calcificação avançada, tornando-o mais rígido (CLARK; VON SCHMIDT, 1965). O formato do clássper pode variar, com alguns deles apresentando estrutura mais complexa, capazes de se abrir como uma flor no interior da fêmea, por exemplo, ou expondo estruturas cartilaginosas em forma de ganchos e esporões que servem para fixá-lo na parede interna da cavidade genital feminina (COMPAGNO, 2001).

Pratt (1979) observou que no tubarão azul (*Prionace glauca*) maduro os dois clásspers são rigidamente calcificados e que no momento da cópula, o clássper 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 clássper atingir um ângulo de 90° em relação ao eixo longitudinal do corpo (COMPAGNO, 1988).

Um par de sacos ou bolsas sifônicas pode ser encontrado sob a pele anteriormente aos clássperes 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 grandes tubarões a capacidade do saco sifônico, que é preenchido por líquido, pode ser medida em litros. Além de musculatura característica, os sacos sifônicos possuem células glandulares que aparentemente secretam um produto rico em serotonina, que é um poderoso estimulante que auxilia na contração da musculatura do trato reprodutivo feminino (DODD et al., 1983, HAMLETT et al., 2007).

Outra estrutura que compõe o aparelho reprodutor masculino são os testículos, que podem variar entre as espécies, tanto na morfologia quanto na disposição funcional. No tubarão peregrino, *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 deste ponto em direção à circunferência, onde ductos eferentes coletam os espermatozóides à medida que amadurecem. Os tubarões da ordem dos Lamniformes apresentam este tipo de testículo. Em carcharhinídeos e sphyrnídeos, entretanto, 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 localizado na superfície do testículo, sendo denominado de testículo composto (PRATT, 1988).

Os elasmobrânquios possuem uma organização testicular única, tornando-os um animal modelo para investigar a interação entre as células germinativas e as células de Sertoli, assim como os hormônios e seus efeitos nos estágios celulares durante o processo da espermatogênese (ENGEL; GIRARD, 2007).

A espermatogênese ocorre dentro dos testículos em estruturas denominadas ampolas, que 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; Grier (1992); Carrier et al. (2004); Hamlett et al. (2007); Mellinger (1965), em estudos sobre testículos de elasmobrânquios, demonstraram a existência de uma relação especial entre a célula de Sertoli e as células germinativas.

Loir et al. (1995) observou que as espermatogônias primárias e as células de Sertoli ficam inicialmente livre dentro do tecido intersticial do testículo, sendo recrutadas por uma membrana basal para formar os espermatocistos (PARSONS e GRIER, 1992). Os espermatocistos contêm muitas células de Sertoli, sendo que cada uma delas encontra-se associada a

um clone de células germinativas, progredindo da direção cranial à direção caudal.

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, espermatídes, e espermatozóides) e uma seqüência definida de complexos eventos celulares, incluindo a proliferação mitótica; apoptose; meiose (o evento central da espermatogênese); e espermiogênese.

Teshima (1981) dividiu esse processo em duas fases: 1) a espermiocitogênese, na qual as células espermatogênicas sofrem processo de divisão até espermatídes; e 2) a espermiogênese, na qual a espermatíde sofre um processo de transformação para espermatozóide, não ocorrendo nenhuma divisão.

Rojas (2003), em um estudo com tubarão *Mustelus schmitti*, observou que em testículos imaturos algumas células da espermatogênese (espermatídes e espermatozoides) estavam ausentes. No entanto, em *Centrophorus squamosus* (GIRARD et al., 2000), *Mustelus Manazo* e *Mustelus griseus* (TESHIMA, 1981), e cistos com espermatídes e espermatozoides foram observados em indivíduos imaturos.

Nos *Mustelus manazo* e *M. griseus*, as cabeças dos espermatozóides apresentam forma de espiral, aspecto também observado em *Cetorhinus maximus*, *Cacharhinus dussumieri*, *Galeorhinus japonicus*, *Rhinobatus schlegeli* e *Scylliorhinus canicula* (METTEN, 1939; TESHIMA 1981). Nas espécies *Scyllium canicula* e *S. catulua*, Metten (1939) e Moore (1895) descreveram que as cabeças dos espermatozóides não são em forma de espiral e sim em linha reta.

Nos tubarões, o sêmen é armazenado nas vesículas seminais e ampola seminal até ser utilizado. Os tubarões de grande porte, como o peregrino, *Cetorhinus maximus*, uma das maiores espécies de tubarão conhecidas, 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 cláspere 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).

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, as atividades das células germinais e células somáticas são coordenadas e interdependentes (HAMLETT, 2007).

A unidade de autorrenovação das células germinativas nas populações de células estaminais se origina no saco viteliníco 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 na 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).

As 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 à existência de células germinativas, dentro de uma anatomia distinta dos “espermatócitos”. Junções gap também são vistas entre as células de Sertoli adjacentes, na região basal da membrana plasmática onde as duas células parecem ser fundidas e reforçadas por microfilamentos e túbulos do retículo endoplasmático liso (MOYNE; 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. Em primeiro lugar, as células de Sertoli do testículo maduro dos elasmobrânquios passam por ciclos de proliferação, diferenciação e degeneração (PUDNEY; CALLARD, 1986), enquanto 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 das células de Sertoli nos elasmobrânquios é voltada 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).

Por fim, 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 locus na zona ampologência, os dois tipos de células se dispõem próximas no mesmo grupo (DODD et al., 1983).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar os aspectos morfológicos do aparelho reprodutor dos tubarões capturados no nordeste brasileiro, buscando detalhar a morfologia dos órgãos reprodutivos.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar morfológicamente os ovários de tubarões costeiros e pelágicos;
- Analisar morfológicamente os úteros de tubarões costeiros e pelágicos;
- Analisar a morfologia dos testículos dos tubarões costeiros e pelágicos;
- Analisar histoquimicamente os ovários e úteros dos tubarões costeiros e pelágicos;
- Caracterizar histoquimicamente os testículos dos tubarões costeiros e pelágicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Área de coleta

No presente estudo, foram examinados 52 tubarões, capturados entre março de 2012 e outubro de 2013, dos quais 26 foram de tubarão *Ginglymostoma cirratum* (dez fêmeas e dezesseis machos), e os outros 26 de três espécies (*Prionace glauca*, n= 8; *Rhizoprionodon lalandii*, n=14; e *Mustelus canis*, n=4), provenientes de duas áreas distintas. A primeira área foi o porto do Mucuripe, Fortaleza/CE (lat: 03°43'00"S; long: 038°28'07"W), onde foram coletados espécimes de *R. lalandii*, um pequeno tubarão costeiro, e *M. canis*, uma espécie demersal que habita plataformas continentais e insulares a cerca de 200 m de profundidade (CONRATH; MUSICK, 2002).

As amostras do aparelho reprodutor de tubarões lixa foram obtidas a partir de animais capturados regularmente por barcos de pesca artesanal e desembarcados no porto de Mucuripe, onde são comercializados sem restrições por ausência de fiscalização. Antes de serem comercializados, foram aferidos os comprimentos total (TL) e comprimento pré-caudal (PC) de todos os animais. Após a evisceração pelos pescadores, os órgãos reprodutivos foram amostrados, sendo então fixados em solução de formalina a 10%.

Os espécimes de *P. glauca*, espécie oceânica, foram coletados no porto de Recife- PE (lat: 8° 03'22"S e long: 34° 51'57" W), depois de terem sido capturados em quatro viagens de pesca por espinheleiros que operam em águas do Oceano Atlântico Sul e Equatorial, tendo os atuns como espécie alvo. Da mesma forma que nos outros espécimes, todos os tubarões azul tiveram os seus comprimentos total (TL) e pré-caudal (PC) aferidos. Após a evisceração pelos pescadores, os órgãos reprodutivos foram coletados e fixados em solução de formalina a 10%.

Descrição macroscópica e caracterização dos ovário e úteros

Os ovários e úteros foram mensurados para obtenção de seu comprimento e largura (cm), sendo classificados macroscopicamente de acordo com os critérios estabelecidos pela ICES (2013). As fêmeas foram classificadas com base em oito estágios de desenvolvimento: imatura, em desenvolvimento,

capazes de se reproduzir, começo do período de gravidez, metade do período da gravidez, fim do período de gravidez, pós parto e em regeneração.

Tabela 1: Critérios utilizados para classificação dos estágios de maturidade das fêmeas de acordo com ICES (2013)

Estágio	Ovário	Glândula Oviducal	Útero
Imaturas (fase I)	Pequeno e esbranquiçado, com folículos ovarianos indiferenciados	Muitas vezes indiferenciada	Filiforme e delgado
Em desenvolvimento (fase II)	Folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, alguns no início da vitelogênese	Evidente	Espessamento da parede uterina
Capazes de se reproduzir (fase III)	Presença de grandes folículos em estágio avançado de vitelogênese, prontos para ovocitar	Espessa	Totalmente desenvolvidos
No começo da gravidez (fase IV a)	Com folículos pós-ovulatórios	Espessa	Espero e arredondado, com presença de ovos capsulados. Nesta fase não é possível visualizar os embriões
Na metade da gravidez (fase IV b)	Com folículos pós-ovulatórios	Espessa	Continua espesso, com os embriões já formados (com nadadeiras, olhos e narinas), ainda dentro da cápsula embrionária, porém sem pigmentação
No final da gravidez (fase IV c)	Com folículos pós-ovulatórios	Espessa	Os embriões já se encontram formados com pigmentação evidente e sacos vitelínicos internos reduzidos ou ausentes
No estágio Pós-parto (fase V)	Possuem folículos e corpo lúteo em diferentes estágios de atresia	Totalmente desenvolvida	Continua espesso, porém flácido
Em regeneração (fase VI)	Grandes com folículos em início de vitelogênese e ausência de folículos pré-ovulatórios. Folículos atrésicos podem estar presentes	Totalmente desenvolvida, embora possa apresentar tamanho reduzido	Flácido

Descrição macroscópica e caracterização dos testículos

Os órgãos reprodutores masculinos em todas as espécies consistem de um par de testículos presos por *mesocrinum* na cavidade peritoneal. A determinação dos estágios de maturação macroscópicos, seguindo ICES (2013),

foi baseado em cinco estágios de desenvolvimento: imaturo, em desenvolvimento, capaz de se reproduzir, ativo ou regredindo. Machos ativos e regredindo, não foram observados.

Tabela 2: Critérios utilizados para classificação dos estágios de maturidade dos machos de acordo com ICES (2013).

Estágio	Clássper	Testículo	Epidídimo
Imaturo	Flexíveis, não calcificados e geralmente mais curtos do que as nadadeiras pélvicas	Finos e delgados	Finos
Em desenvolvimento	Flexíveis, parcialmente calcificados e passando das nadadeiras pélvicas	Desenvolvidos, mas não ocupando toda a superfície do órgão epigonal	Desenvolvido
Capaz de se reproduzir	Rígidos, totalmente calcificados e passando das nadadeiras pélvicas	Totalmente desenvolvidos e bem irrigados	Bem enovelado e cheio de esperma
Ativo	Rígidos e totalmente calcificados	Totalmente desenvolvidos	Com presença de esperma
Regredindo	Rígidos e totalmente calcificados, passando das nadadeiras pélvicas	Flácidos	Vazio e flácido. Vesícula seminal desenvolvida, mas vazia

Caraterização histológica

Após 24 horas de fixação, os órgãos foram clivados e re-fixados em formalina a 10% por mais 24 horas, sendo, em seguida, transferidos para etanol a 70%. Posteriormente, as amostras foram enviadas para a Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde o processo histológico foi realizado. Os fragmentos de ovário, útero e testículos foram então desidratados em etanol, em concentrações crescentes, de 80%, 90%, 95%, 100% I e 100% II, diafanizados em álcool butílico, impregnados e embebidos em paraplast. Os blocos de paraplasts foram então cortados com o micrótomo Minot (Leica), ajustado para 5 micrómetros (μm), com os cortes sendo, em seguida, colocados em lâminas, que foram mantidas na estufa a 37°C durante 24 horas para a secagem. Os cortes foram então corados com hematoxilina/ eosin- floxina, tricrômico de Gomori, PAS e Azul de alcian 2,5%.

As imagens dos cortes histológicos dos ovários e úteros foram capturadas usando um microscópio biológico Trinocular NIKON 50i, juntamente com um sistema de câmera usado para capturar imagens microscópicas. As Imagens

morfológicas dos cortes histológicos dos testículos foram analisadas na Universidade de Manchester, utilizando um scanner Panoramic 250 Flash II (3DHISTECH Ltd., Hungria), enquanto as imagens foram analisadas utilizando o programa Panoramic Viewer (3DHISTECH Ltd., Hungria).

Análise morfométrica

Para os machos amostrados que foram classificados no estágio maturacional “capaz de reproduzir” (*R. lalandii* e *P. glauca*), foram determinados cinco tipos diferentes de células: espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides e espermatozóides, seguindo Callard (1989). O diâmetro dos espermatocistos arredondados em cada fase celular foi medido e o número de células de Sertoli foi quantificado. O teste de Shapiro-Wilkinson foi conduzido para testar a normalidade dos dados ($\alpha = 0,05$). A diferença entre *R. lalandii* e *P. glauca* foi testada usando análise de variância e teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). Em cistos de espermatócitos I e II, o diâmetro da célula foi medido em dez células dentro de três cistos diferentes. Os espermatócitos arredondados medidos foram então escolhidos seguindo a zona germinal de bordo marginal.

5. REFERÊNCIAS

BABEL, T. S. Reproduction life history, and ecology of the round stingray, *Urolophus halleri* Cooper. **Calif. Fish Game**, v.137, p. 1–104, 1967.

BANNISTER, K. The Book of Shark. **Ed. Grange Books**. p. 128.1996

BASS, A. J., J. D. D'AUBREY, N. KISTNASAMY. Sharks of the east coast of southern Africa. I.The genus *Carcharhinus* (Carcharhinidae). **Oceanographic Research Institute (Durban) Investigational Report No. 33**, 1973.

BUDKER, P. La viviparité chez les sélachiens, in *Traité de Zoologie: Anatomie, Systematique, Biologie*. **P. P. Grassé, Ed., Maisson et Cie Editeurs Libraires de l'Académie de Médecine**. Paris, p. 1755–1790. 1958.

CLARK, E.; K. VON SCHMIDT. Sharks of the central Gulf Coast of Florida. **Mar. Sci.** 15:13–83. 1965.

CHAMPY, C. AND GLEY, P. Observations cytologiques sur les ovocytes des poissons et de quelques autres vertébrés. **Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale**. v. 19, p.241-308. 1923.

CALLARD, I.P. GIANNOUKS, G.I; CHARNOCK-JONES, D.S; BENSON, S & PAULUCCI, M. Hormone Regulation of Vitelogenin Genes and the Evolution of Viviparity. **Perspectives in comparative endocrinology**. P. 325- 332. 1994.

CALLARD, G. Reproduction in male elasmobranch fishes. In R. Kinne, E. Kinne-Saffran and K. Beyenbach (eds), *Oogenesis, Spermatogenesis and Reproduction*. **Karger**, Basel. Pp. 104-154. 1991A.

CALLARD, G. Spermatogenesis. In P. Pang and M. Schreiber (eds), *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biochemical implications*. **Academic Press**, New York. Pp. 303-41. 1991B

CALLARD, G. Regulation of spermatogenesis: the shark testis model gloria callard, paul mak, wilfrid dubois, and maria elena cuevas department of biology, boston university, boston, massachusetts 02215. **The Journal of Experimental Zoology Supplement**. v. 2, p. 23-34. 1989

CALLARD, I. P., CALLARD, G. V., LANCE, V., BOLAFFI, J. L. ROSSET, J. S. Testicular regulation in non-mammalian vertebrates. **Biology of Reproduction**. v.18, p. 16-43. 1978.

CASTRO, J. The Sharks of North American Waters. **Texas A&M University Press**, College Station. 1983

CHIEFFI. Sex Differentiation and Experimental Sex Reversal in Elasmobranchi Fishes. **Instituto di Genetica, Università di Napoli**, Napoli, Italy. 1949.

CLEAVE, A. SHARKS: A Portrait of the Animal World. **Ed. Smithsonian**. p. 80. 1994.

CARRIER, J. C., PRATT JR, H. L. CASTRO, J. I. Elasmobranch Reproduction. In J. C. Carrier, J. A. Musick and M. R. Heithaus (eds), *Biology of Sharks and Their Relatives*. **CRC Press, LLC**. Boca Raton. Pp.269-286. 2004.

COMPAGNO, L. J. V. Sharks of The Order Carcharhiniformes. **Princeton University Press**, Princeton, New Jersey, USA. P. 486. 1988.

COMPAGNO, L. J. V. Alternative life history styles of cartilaginous fishes in time and space. **Environm. Biol. Fishes**. v. 28: 33-75. 1990.

COMPAGNO, L.J.V. Checklist of Living Elasmobranchs. Hamlett W.C. (ed.) *Sharks, Skates, and Rays: The Biology of Elasmobranch Fishes*. **Johns Hopkins University Press**, Baltimore. pp. 471–498. 1999.

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** FAO, Rome. v. 1(2). P.269. 2001.

COMPAGNO, L. J. V.; Fowler S. Sharks of the World. **Princeton university press**. Princeton. 2005.

CONRATH, C.L and Musick, J. A. Reproductive biology of the smooth dogfish, *Mustelus canis*. **Environ. Biol. Fish**. v. 64, p. 367- 377. 2002.

CONRATH, C.L. Reproductive Biology. **Virginia Institute of Marine Science**, College of William and Mary, Gloucester Point, USA. v. 7. 2004.

Daniel, J. F. The elasmobranchfishes. **Univ. Calif. Press**, Berkeley. 1928.

DAVENPORT, I. R. Comparative morphology of oogenesis pertaining to the evolution of extreme egg size in Chondrichthyan fishes. Ph.D. Thesis. **Clemson University, Clemson**, South Carolina. 2003.

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

ENGEL, K.B; CALLARD, G.L. THE TESTIS AND SPERMATOGENESIS, CHAPTER 6. P. 184-2013. 2007

FAWCETT, D. W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In Hamilton and Greep (eds), **Handbook of Physiology, sect. 7. Endocrinology, Male Reproductive System**. **American Physiological Society**, Washington. v. 5, p. 21-56. 1975.

GADIG, O. B. F., Peixes Cartilaginosos da Costa do Estado de São Paulo. **Cecilia**, VIII (9), p.41-51. 1998.

GRISWOLD, M.D. Protein secretions of Sertoli cells. **Int. Rev. Rev. Cytol.**, v. 110, p. 133-148. 1988.

GROGAN, E. D.; LUND, R. Origin and relationships of early Chondrichthyes. IN J. C. CARRIER, J. A. Musick, and M. R. Heithaus (eds), *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Gilmore, R. G. 1993. Reproductive biology of lamnoid sharks. **Environmental Biology of Fishes**. v.38: 95-114. 2004.

GIACOMINI, E. Contributo all'istologia dell'ovario dei Selaci. **Rish. Lab. Anat. Norm.** Univ. Roma. v.5, p.221-274. 1988. Griswold, M., Morales, C. and Sylvester, S. Molecular biology of the Sertoli cell. **Oxford Review of Reproductive Biology**. v. 10, p. 124-161. 1996.

GILMORE, R. G., J. W. DODRILL, AND P. A. LINLEY. Reproduction and Embryonic Development of The Sand Tiger Shark, *Odontaspis taurus* (rafinesque). *Fish. Bull.* v. 81, p.201-225. 1993. Reproductive Biology of Lamnoid Sharks. **ENVIRON. BIOL. FISH.** v. 38, p.95-114. 1983.

GILMORE, R.G. Reproductive Biology of Lamnoid sharks. **Env. Biol. Fish.** v. 38, p. 95–114. 1993.

GIRARD, M.; RIVALAN P, SINQUIN, G. Testes and Sperm Morphology in Two Deep- Water Squaloid Sharks, *Centroscyrnus ceololepis* and *Centrophorus squamosus*. **J FISH BIOL.** v. 57, p. 1575-1589. 2000.

HAMLETT, W. C. Reproductive modes of elasmobranchs. *Shark news* 9. 1997.

HAMLETT, W. C.; KOOB, T. Female reproductive system. In *Sharks, Skates and Rays: The Biology of Elasmobranchs Fishes*. **Johns Hopkins University Press**, Baltimore, Maryland. Pp. 398-443. 1999.

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

HAMLETT, W. C.; JEZIOR, M.; 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.

HAMLETT, W. C.; J. P. WOURMS, AND J. S. HUDSON. Ultrastructure of the full term shark yolk sac placenta. I. Morphology and cellular transport at the fetal attachment site. **J. Ultrastructure. Res.** v. 91, p. 192-206. 1985.

ICES. Report of the Workshop on Sexual Maturity Staging of Elasmobranchs (**WKMSSEL**), 11-14 December 2012, Lisbon, Portugal. ICES cm 2012/acom. v. 59. p. 66 .2013.

IN MMA nº 05/2004. Reconhece como espécies ameaçadas de extinção e espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração, os invertebrados aquáticos e peixes, constantes dos anexos à **instrução normativa**, Brasília, DF. BRASIL. 2004.

IUCN. 2012. IUCN Red List of Threatened Animals. **IUCN, Gland**, Switzerland and Cambridge, UK. 2012.

JOUNG, S. J.; C.T. CHEN, E.; CLARK, S.; UCHINDA, AND W. Y. P. HUANG. The Whale Shark, *Rhincodon typus*, is a Livebearer: 300 Embryos Found in One 'Megamamma' Supreme. **ENVIRON. BIOL. FISH.** v. 46, p. 219-223. 1996.

LOVEJOY, N.R. 1996. Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). **Zool. J. Linn. Soc.** v. 117, p. 207-257.

LOIR, M.; SOURDAINE, P.; MENDIS-HANDAGAMA, S. M.L.C.; JE ´GOU B. Cell Interactions in the Testis of Teleosts and Elasmobranchs. **Microsc Res Tech.** v. 32, p. 533–552. 1995.

MATTHEWS, L. H. Reproduction in the basking shark, *Cetorhinus maximus* (GUNNER). **Phil. Trans. Roy. Soc.** London. Series B, v. 234, p. 247-316. 1950.

MARUSKA, K. P., E. G. COWIE, AND T. C. TRICAS. Periodic gonadal activity and protracted mating in elasmobranch fishes. **J. EXP. ZOOL.** v. 276, p.219-232.1996.

METTEN, H. Studies on the reproduction of the dogfish, *Phil. Trans. Roy. Soc.* London. Series B, 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.

MOTA, F. S.; GADIG, O. B.F; NAMORA, R.C.; BRAGA, F. M.S. Size and sex compositions, length-weight relationship, and occurrence of the Brazilian sharpnose shark, *Rhizoprionodon lalandii*, caught by artisanal fishery from southeastern Brazil. **Fisheries Research.** v.74, p. 116-126. 2005.

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.

NELSON, J. S. "Fishes of theWorld," **3rd ed.Wiley**, New York. 1994.

OTAKE, T. Classification of reproductive modes in sharks with comments on female reproductive tissues and structures, In: Elasmobranchs as living resources: advances in biology, ecology, systematics and status of the fisheries. H.L. Pratt, Jr., S.H. Gruber, and T. Taniuchi (ed.). **U.S. Dept. Commerce, NOAA Tech. Rep. NMFS.** v. 90. p. 111-130. 1990.

PARSONS, G. R. H. J. GRIER. Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. **J. Exp. Zool.** v. 261, p.173–184. 1992.

PAXTON, J. R, AND W. N. ESCHMEYER. Encyclopedia of Fishes. **Academic Press**, New York, New York. 1994.

PRATT, H. L. JR. Reproduction in The Blue Shark, *Prionace glauca*. **Fishery bulletin**. v. 77, p. 445–470. 1979.

PRATT, H. L. Elasmobranch gonad structure a description and survey. **Copeia**. p. 719–729. 1988.

PUDNEY, J., and G.V. Callard. Development of the agranular endoplasmic reticulum in Sertoli cells of the dogfish *Squalus acanthias* during spermatogenesis. *Anat. Rec.*, v. 209, p. 311-321. 1984.

PUDNEY, J. & G.V. CALLARD. Sertoli Cell Cytoplasts in Semen of the Spiny Dogfish (*Squalus acanthius*). **Tissue Cell**. v. 18, p. 375- 382. 1986.

RITZEN, E. M., HANSSON, V. FRENCH, F. S. The Sertoli cell. In B. deKrester (ed.), **The Testis**. **Raven Press**, New York. p. 269-302. 1989.

ROJAS, F. O. Testicular Histology of *Mustelus schmitti*. Springer, 1939 (elasmobranchii, triakidae). **Bioscriba**. v. 6(1), p. 16-32. 2013.

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.

SNELSON, F.F., S. E. WILLIAMS-HOOPER, & T. H. SCHMID. Reproduction and ecology of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*, in Florida coastal lagoons. **Copeia** **1988**. p. 729-739. 1988.

STANLEY, H. P. The structure and development of the seminiferous follicle in *Scylliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). **Z. Zellforsch.** v. 75, 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, WILLIAM. Observations on ovarian ova and follicles in certain teleostian and elasmobranch fishes. **Quart. Jour. Mic. Sci.**, v. 47 (186), p.161–213. 1903.

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

WOURMS, J.P., AND J. LOMBARDI. Reflections on the evolution of piscine viviparity. *Amer. Zool.* v. 32, p. 276-293. 1992.

WOURMS, J. P., B. D. GROVE, and J. LOMBARDI. The Maternal Embryonic Relationship in Viviparous Fishes. In: **Fish Physiology**. Hoar, W. S. and D. J. Randall (eds.). San Diego, **Acad. Press**, p. 1–134. 1988.

1º ARTIGO - Descrição morfológica do ovário e úteros do tubarão lixa (*Ginglymostoma cirratum*, Bonaterre, 1778) capturados na praia de Mucuripe, Fortaleza-CE. (A ser submetido Neotropical Ichthyology)

Resumo

Ginglymostoma cirratum, é uma espécie vivípara lecitotrófica, que apresenta dois ovários, onde apenas o direito é funcional, suspensos pelo mesentério na porção anterior da cavidade abdominal e estão associados ao órgão epigonal, sendo do tipo interno. O objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia do ovário e úteros do tubarão lixa *G. cirratum*. As mostras de ovário e útero dos exemplares foram obtidas durante o desembarque destes indivíduos na praia de Mucuripe, Fortaleza, Ceará. Das dez fêmeas amostradas, oito se encontravam no estágio imaturo e apenas duas no estágio de desenvolvimento. Histologicamente os ovários imaturos apresentavam revestimento de tecido epitelial simples variando de cúbico a colunar. Nas fêmeas no estágio de desenvolvimento, os ovários apresentaram revestimento de epitélio simples cúbico. Em ovócitos em vitelogênese foi observado, um aumento do diâmetro, pelo aumento da espessura da camada de células foliculares. Em todas as fases do desenvolvimento folicular, foram observados sinais de atresia. O útero do tubarão lixa, antes da maturação é constituído por três camadas: mucosa, muscular e serosa. Uma camada acelular de natureza proteica foi evidenciada abaixo da túnica mucosa. Nas fêmeas jovens a porção mediana do útero se apresentou com pequenas projeções papiliformes do epitélio pseudoestratificado colunar com microvilosidades. Para as fêmeas no estágio de desenvolvimento, na camada mucosa do oviduto foi observada a presença de invaginações revestidas por epitélio simples colunar ciliado. No epitélio do corpo uterino observou-se a presença de vascularização no epitélio, nas fêmeas no estágio em desenvolvimento, o que sugere a contribuição materna na homeostase do embrião.

Palavras-chave: Histologia; Reprodução; Elasmobranquios.

Descrição morfológica do ovário e úteros do tubarão lixa (*Ginglymostoma cirratum*, Bonaterre, 1778) capturados na praia de Mucuripe, Fortaleza-CE.

Mariana G. Rêgo^{1,2*}, Fábio H. V. Hazin¹ & Joaquim Evêncio Neto².

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Oceanografia Pesqueira, rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP:52.171-900. Fone: 55-81-33206510 /55-81-33206516/Fax: 55-81-33206512; mari_rego03@hotmail.com

² 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; evencio@dmfa.ufrpe.br; e-mail: mari_rego03@hotmail.com

Introdução

O tubarão lixa, *Ginglymostoma cirratum* (Bonaterre, 1778) é uma espécie abundante em águas tropicais e subtropicais, encontrando-se presente ao longo de toda a costa do nordeste brasileiro. De hábito costeiro, é muito utilizado em aquários de todo o mundo, por ser considerado um animal extremamente dócil e resistente (Cervigón & Alcalá 1999; Compagno 2005; Garla et al., 2008; Santander-Neto et al., 2010).

Embora seja uma espécie que no Brasil é protegida por lei (IN05-2004 MMA), existem inúmeros relatos da pesca indevida e da utilização desses animais em aquários sem a licença dos órgãos responsáveis (Arthaud, 1999; Gruber & Sundström, 2000; Rosa et al., 2005).

Segundo Castro (2000), os tubarões lixa, que chegam a medir até 4 m de comprimento, são vivíparos lecitotróficos, podendo ter fucundidade uterina de 10 a 20 embriões por útero, com um período de gestação em torno de 5 meses. O seu aparelho reprodutor apresenta as mesmas características anatômicas compartilhadas por outros elasmobrânquios, com dois ovários, intimamente associados ao órgão epigonal, (apenas o ovário direito é funcional), duas glândulas oviducais e dois úteros. O órgão epigonal envolve grupos de folículos ovígeros, caracterizando o tipo interno de ovário (Pratt, 1988; Castro, 2000).

O *G. cirratum* é uma das espécies de elasmobrânquios mais estudadas com relação ao seu sistema imunológico (Castro, 2000), porém o conhecimento acerca da sua biologia e hábitos na natureza ainda são raros, limitando-se aos trabalhos de comportamento reprodutivo (Klimley, 1980; Pratt e Carrier 1998; Saville et al., 2001). Diante disso este trabalho teve o objetivo de descrever os aspectos morfológicos do ovário funcional e do útero do tubarão lixa.

Material e Métodos

Área de coleta

Dez fêmeas de tubarão lixa foram coletadas no porto do Mucuripe, Fortaleza- CE (lat: 03°43'00''S; long: 038°28'07''W), no período de setembro de 2012 a junho de 2013. Os tubarões lixa estão listados como Vulneráveis no Brasil (IUCN, 2012) e, consequentemente, incluídos na Lista Oficial de Animais em extinção (IN05/2004 MMA). Os indivíduos analisados neste trabalho não foram capturados com pesca científica e/ou experimental. As amostras de ovário e útero foram obtidas a partir de animais capturados regularmente por barcos de pesca artesanal, e desembarcados no porto de Mucuripe, onde são comercializados sem restrições por ausência de fiscalização. Esta captura representa de 15% a 20% dos desembarques anuais de tubarão no porto de Mucuripe-CE (Arthaud, 1999). Antes de serem comercializados, foram aferidos o comprimento total (TL) e o comprimento pré-caudal (PC) de todos os exemplares. Após a evisceração pelos pescadores, os ovários e úteros foram amostrados e então fixados em solução de formalina a 10%.

Descrição macroscópica e caracterização dos ovários e úteros

Os ovários e úteros foram mensurados para obtenção de seu comprimento e largura (cm), e a sua classificação macroscópica determinada de acordo com critérios estabelecidos

pela ICES (2013). As fêmeas foram classificadas com base nos oito estágios de desenvolvimento: imatura, em desenvolvimento, capazes de se reproduzir, começo da gravidez, metade da gravidez, fim da gravidez, pós parto e regeneração (Tabela. 1).

Análise histológica

Após 24 horas de fixação, os órgãos foram clivados e re-fixados em formalina a 10% por mais 24 horas, tendo sido, em seguida, transferidos para etanol a 70%. Posteriormente, as amostras foram enviadas para a Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde o processo histológico foi realizado. Os fragmentos de ovário e útero foram então desidratados em etanol, em concentrações crescentes, de 80% a 100%, diafanizados em álcool butílico, impregnados e incluídos em paraplast. Os blocos de paraplast foram então cortados com micrótomo tipo Minot (Leica), ajustado para 5 micrômetros (μm), acondicionando-se, em seguida, os cortes em lâminas, que foram mantidas na estufa a 37°C durante 24 horas para a secagem. Os cortes foram então corados com hematoxilina / eosina – floxina, tricrômico de Gomori, PAS e Azul de Alcian 2,5%.

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas usando um microscópio biológico Trinocular NIKON 50i, juntamente com um sistema de câmera usado para capturar imagens microscópicas.

Resultados

Os ovários do tubarão lixa estão suspensos pelo mesentério na porção anterior da cavidade abdominal, encontrando-se fortemente associados ao órgão epigonal, sendo do tipo interno, e apresentando apenas o ovário direito funcional.

Das dez fêmeas capturadas oito se encontravam no estágio imaturo e apenas duas no estágio de desenvolvimento. As fêmeas imaturas (fase I) variaram seu comprimento total (CT) entre 85 e 135 cm. O aparelho reprodutivo apresentou o ovário funcional

esbranquiçado com largura variando de 1,5 a 2,5 cm, com folículos visíveis apenas através da microscopia. O ovário estava embebido no órgão epigonal, exibindo, na porção cranial, morfologia semelhante a uma rede (Fig. 1A). Nas observações de secção transversal do ovário foi possível visualizar o englobamento dos folículos ovarianos pelos componentes estruturais do órgão epigonal. O útero (largura variando entre 0,5 a 1,5 cm) se encontrava filiforme, com paredes extremamente delgadas e a glândula oviducal pequena (variando entre 0,2 a 0,5 cm) em início de diferenciação. No estágio de desenvolvimento (fase II) as fêmeas tiveram comprimento total (CT) de 152 e 164 cm. O ovário apresentou largura entre 3 e 4 cm, e folículos em diferentes fases de vitelogênese (Fig.1B). Os úteros apresentaram paredes mais espessas (variando entre 2 e 2,5 cm) e a glândula oviducal (variando entre 1 a 1,2 cm) já se encontrava diferenciada, sendo facilmente visível na região cranial do útero.

Ovário

Histologicamente os ovários imaturos apresentavam revestimento de tecido epitelial variando de cúbico a colunar, com invaginações, formando criptas na sua superfície externa, o que na visão macroscópica causa a aparência de redes. O estroma do órgão epigonal foi facilmente visibilizado nos cortes histológicos. Interiormente, o ovário é separado do estroma do órgão epigonal por uma camada de tecido conjuntivo, que se ramifica, formando septos incompletos, e dividindo a região cortical do ovário em lóbulos com lotes ovígeros distintos (Fig. 1C). Em cada lote ovígero é possível visualizar folículos-primordiais com ovócito I e folículos primários com ovócito I, que compõem as principais fases do desenvolvimento folicular neste estágio de maturação ovariana (Fig. 1D). A variação observada no epitélio ovariano está diretamente relacionada à presença dos lotes ovígeros, que é cúbico na região dos lotes ovígeros (Fig. 1E) e colunar na superfície do ovário entre os lotes (Fig, 1F).

Os ovários no estágio de desenvolvimento apresentaram folículos no início de vitelogênese, com ovócitos nos estágios I e II da vitelogênese (Fig. 2A). Nesta fase do desenvolvimento folicular, a camada de células foliculares estava bem definida ao redor dos ovócitos (Fig. 2B). Da mesma maneira que foi observado nos ovários imaturos, a superfície do ovário apresenta-se revestida por epitélio simples, variando de colunar a cúbico, com criptas mais desenvolvidas (Fig. 2C). Os lotes ovígeros formados pelos septos incompletos de tecido conjuntivo são facilmente visíveis microscopicamente (Fig. 2D). No processo de vitelogênese observado, ocorreu um aumento do diâmetro do ovócito, pelo aumento da espessura da camada de células foliculares, e a camada de glicoproteína envolvendo a membrana ovocitária e a teca tornando-se facilmente visíveis. As células do epitélio ovariano apresentaram reatividade para o azul de Alcian pH 2.5, indicando que estas células apresentam a habilidade de secretar mucopolissacarídeos ácidos (Fig. 2E). Em todas as fases do desenvolvimento folicular, foram observados sinais de atresia, caracterizada pela presença de núcleos fragmentados, sugerindo ocorrência de apoptose celular (Fig. 2F). Nesta fase de maturação ovariana, o desenvolvimento folicular causa a compressão do estroma do órgão epigonal.

Útero

Os resultados mostraram que o útero do tubarão lixa, antes da maturação é constituído por 03 (três) camadas: mucosa, muscular e serosa (Fig. 3A). A mucosa uterina é revestida internamente por epitélio simples colunar e não apresenta glândulas uterinas (Fig. 3C). Logo abaixo do epitélio de revestimento, encontra-se a lâmina própria, pouco desenvolvida, constituída de tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos e linfáticos. A camada muscular é constituída de duas camadas bem desenvolvidas de tecido muscular liso com presença de vasos sanguíneos e linfáticos (Fig. 3D). A serosa

é uma fina camada constituída de tecido conjuntivo frouxo e revestida externamente por tecido epitelial simples plano (Fig. 3B). Foi evidenciada uma camada acelular de natureza proteica, provavelmente de natureza colágena, pela reação positiva ao Tricrômico de Gomori e baixa reatividade ao azul de Alcian pH 2.5%, entre o epitélio e o conjuntivo (Fig. 3E). Nas fêmeas jovens a porção mediana do útero se apresentou com pequenas projeções papiliformes do epitélio pseudoestratificado colunar com microvilosidades (Fig. 4C). Para as fêmeas no estágio de desenvolvimento, na camada mucosa do oviduto foi observada a presença de invaginações revestidas por epitélio simples colunar ciliado, (Fig. 4B). Na região mediana do corpo uterino a camada mucosa apresenta-se constituída de papilas revestidas por uma única camada de epitélio cilíndrico com células que apresentaram intensa reatividade ao azul de Alcian pH 2,5 (Fig. 4A). No epitélio do corpo uterino observou-se a presença de vascularização no epitélio, nas fêmeas no estágio em desenvolvimento (Fig. 3F).

Discussão

Segundo Carrie (2004) e Hamlett (2007) os tubarões possuem dois ovários que são emparelhados e localizados na extremidade anterior da cavidade abdominal. Normalmente, os dois ovários são funcionais, porém, em alguns gêneros, tais como no *Scyliorhinus*, *Carcharhinus*, *Mustelus*, e *Sphyrna*, apenas o ovário direito é funcional. O ovário esquerdo, embora presente com as estruturas histológicas, não se desenvolve, devido a posição do fígado na cavidade abdominal, que por sua vez, comprime o órgão epigonal esquerdo impedindo assim o desenvolvimento folicular do ovário. O *G. cirratum* também possui apenas o ovário direito funcional. Mathews (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 ovócitos pequenos que variam entre 3 a 5 mm de diâmetro, para servirem como alimento na estratégia ovofágica, adotada por tubarões desta ordem. Este tipo de ovário é conhecido como interno. 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 ovócitos de tamanho relativamente grande, geralmente variando entre 20 a 60 mm de diâmetro, e é considerado externo.

Para a família Laminidae o tipo de ovário que se enquadra é do tipo interno que é embebido pelo órgão epigonal e separado do mesmo pelo tecido conjuntivo que invagina formando septos, dividindo o ovário em grupos individualizados de lotes ovígeros (Pratt, 1988). Este tipo de ovário pode representar uma estratégia reprodutiva para otimizar o potencial reprodutivo da espécie. Embora o *Ginglymostoma cirratum*, único representante da família Ginglymostomatidae, apresente modo reprodutivo distinto da família Laminidae, a sua morfologia ovariana foi semelhante à descrita para os Laminiformes. Mathews (1950) descreve as mesmas características para o ovário de *Cetorhinus maximus*. Fujita (1981) também encontrou características de ovário interno para espécies do gênero *Megachasma* e *Mitsukurina*.

No presente estudo, nos indivíduos de *G. cirratum*, a presença do tecido conjuntivo entre o órgão epigonal e o ovário que se ramifica criando áreas onde se observou a formação de lotes ovígeros distintos, também foi observado por Mathews (1950) em ovário de *C. maximus*.

O útero de elasmobrânquios é composto por um epitélio, com a lâmina basal associada, uma lâmina subjacente contendo vasos de diferentes dimensões, feixes de fibras colágenas e fibroblastos, e uma camada de músculo liso, sendo delimitado por uma

delgada camada serosa constituída de tecido conjuntivo frouxo e epitélio simples plano. A mesma morfologia foi observada neste trabalho. No entanto, em *G. cirratum* a camada acelular colágena observada pode ser um constituinte da lâmina basal sendo, portanto mais desenvolvida do que aquela descrita para *Squalus acanthias* (Hamlet, 1998).

A vascularização da mucosa do útero é mais proeminente em espécies vivíparas matrotóricas, pela dependência de nutrição do embrião da mãe. No entanto, esse tipo de modificação aumenta também o suprimento de oxigênio para o lúmen uterino, aumenta a área de superfície para a troca metabólica e reduz a distância de difusão para a troca gasosa (Koob; Hamlett, 1998), sendo portanto também visibilizada nas espécies lecitotóricas, como *S. acanthias* (Hamlet, 1998) e *G. cirratum* neste trabalho.

A vascularização elaborada e a diferenciada do epitélio da mucosa uterina cria um ambiente uterino que possibilita a sobrevivência do embrião ao longo da gestação no tipo de reprodução lecitotórica, indicando que há uma dependência fisiológica do embrião do organismo materno. No final da gravidez ocorre um aumento da vascularização, que está relacionada com o aumento da demanda metabólica dos embriões maiores (Hamlett, 1998), confirmado pelo estudo Joung et al., (1996) com o tubarão *Rhcodon typus*, que observou um aumento na vascularização uterina para auxiliar na troca gasosa dos embriões com o organismo materno.

Apesar de no presente estudo não ter sido observado nenhuma fêmea no final de gravidez, a observação da vascularização do epitélio na fêmea no estágio de desenvolvimento sugere que em *G. cirratum*, conforme o estágio gestacional avança, deve ocorrer um aumento da vascularização do corpo uterino, principalmente após o rompimento da cápsula embrionária, como descrito por (Joung et al., 1996; Hamlett, 1998) para outras espécies lecitotóricas, como *S. acanthias* e *Rhcodon typus*.

No entanto, para se determinar a especialização da vascularização uterina, como também se a formação de grupos específicos de ovócitos é a melhor estratégia para perpetuação da espécie, faz-se necessário um estudo morfológico mais amplo dos úteros e dos ovários nos diversos estágios maturacionais.

Referências Bibliográficas

- Arthaud, I. D. B. 1999. Fauna de tubarões alvo da pesca artesanal na praia de Mucuripe, Fortaleza—CE (Chondrichthyes, Elasmobranchii). BSc Monograph. Federal University of Ceara —UFC Fortaleza, Brazil.
- Cervigón, F. & Alcalá, A. 1999. Los peces marinos de Venezuela. Tiburones y Rayas. Fundación Museo del Mar. Vol. 5.
- Castro, J. I. 2000. The biology of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, off the Florida East Coast and the Bahama Islands. *Environmental Biology of Fishes* 58, 1–22.
- Compagno, L. J. V., Ando, M. & Fowler, S. 2005. *Sharks of the world*. Princeton: Princeton University Press.
- Garla et al., 2008. Fernando de Noronha as an insular nursery area for lemon sharks, *Negaprion brevirostris*, and nurse sharks, *Ginglymostoma cirratum*, in the equatorial western Atlantic Ocean. *JMBA2 - Biodiversity Records*.
- Gruber, S. & Sundström, L. F. 2000. *Negaprion brevirostris*. In IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Accessed on 14 December 2007.
- ICES. 2013. Report of the workshop on Sexual Maturity Staging of Elasmobranchs (WKMSSEL), 11-14 December 2012, Lisbon, Portugal. ICES CM 2012/ACOM :59. Pp. 66.

- 238 Joung, S.J., Chen, C.T.; Clark, E.; Uchida, S.; & Huang, W.Y.P. 1996. The whale shark,
 239 *Rhcodon typus*, is a livebearer: 300 embryos found in a ‘megamamma’ supreme.
 240 Environ. Biol. Fishes, RTX. p.219–223.
- 241 Koob, T.J. & Hamlett, W.C. 1998. Microscopic structure of the gravid uterus in the
 242 little skate, *Raja erinacea*. J. Exp. Zool.
- 243 Matthews, L. H. 1950. Reproduction in the basking shark, *Cetorhinus maximus*
 244 (Gunner). Phil. Trans. Roy. Soc. Land. Ser. B. Biol. Sci. v. 234, p. 247-316.
- 245 Needham, J. 1942. Biochemistry and Morphogenesis. Cambridge University Press,
 246 Cambridge. Otake,
- 247 Pratt, H. L. Jr. 1988. Elasmobranch gonad structure a description and survey. Copeia,
 248 p. 719–729.
- 249 Rosa, R. S.; Castro, A. L. F.; Furtado, M.; Monzini, J. & Grubbs, R. *Ginglymostoma*
 250 *cirratum*. In IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species.
 251 <www.iucnredlist.org>. Accessed on 14 December 2007
- 252 Ranzi, S. 1932. Le basi fisio-morfologiche dello sviluppo embrionale dei Selaci: Parte I.
 253 Pubbl. Staz. Zool. Napoli, IQX209–290.
- 254 Ranzi, S. 1934. Le basi fisio-morfologiche dello sviluppo embrionale dei Selaci: Parte
 255 II e III. Pubbl. Staz. Zool. Napoli, IQX331–437.
- 256 Hamlett, W.C. & Koob, T. 1999. Female reproductive system. Pp. 398-443. In Hamlett,
 257 W. C. (ed.), Sharks, Skates and Rays: The Biology of Elasmobranchs Fishes. Johns
 258 Hopkins University Press, Baltimore, Maryland
- 259 Hamlett, W. C. 2007. The Testis and Spermatogenesis. Pp. 171- 200. In: K.B. Engel &
 260 G.V. Callard (Eds.). Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks,
 261 batoids, and chimaeras. v. 3. Inc. Enfield (NH), USA. Science Publishers. 562p.

262 Santander-Neto et al., 2010. Population structure of nurse sharks, *Ginglymostoma*
263 *cirratum* (Orectolobiformes), caught off Ceara State, Brazil, South-western Equatorial
264 Atlantic. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v.91(6),
265 p.1193–1196.

Tabela 1: Critérios utilizados para classificação dos estágios de maturidade de *G. cirratum* de acordo com ICES (2013)

Estágio	Ovário	Glândula Oviducal	Útero
As fêmeas imaturas (fase I)	Pequenos e esbranquiçados folículos ovarianos indiferenciados	Muitas vezes se encontra indiferenciada.	Em alguns espécimes, ocorre um espessamento do útero onde a glândula vai se diferenciar. Útero fino e estreito.
Em desenvolvimento (fase II)	Folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Presença de alguns folículos no início da vitelogênese.	Evidente	Espessamento da parede uterina
As fêmeas capazes de se reproduzir (fase III)	Presença de grandes folículos em estágio avançado de vitelogênese, prontos para ovocitar.	Espessa	Totalmente desenvolvidos
Fêmeas no começo da gravidez (fase IV a),	Presença de folículos pós-ovulatórios (corpo lúteo) e folículos em ovocitação.	Espessa	Completamente espesso, e arredondado, com presença de ovos capsulados. Nesta fase não é possível visualizar os embriões.
Fêmeas na metade da gravidez (fase IV b)	Com folículos pós-ovulatórios	Espessa	Continua espesso, porém nesta fase os embriões estão formados (com nadadeiras, olhos, narinas, etc), embora ainda se encontrem dentro da cápsula embrionária, porém sem pigmentação.
Fêmeas no final da gravidez (fase IV c)	Com folículos pós-ovulatórios	Espessa	Os embriões já se encontram formados com pigmentação evidente e sacos vitelínicos internos reduzidos ou ausentes.
Fêmeas no estágio Pós parto (fase V)	Possuem folículos e corpos lúteos em diferentes estágios de atresia.	Totalmente desenvolvida	Continua espesso, porém flácido
Regeneração (fase VI)	Grandes com folículos em início de vitelogênese, ausência de folículos pré-ovulatórios. Nesta fase os folículos atrésicos podem estar presentes.	Totalmente desenvolvida, podendo apresentar tamanho reduzido	Flácido

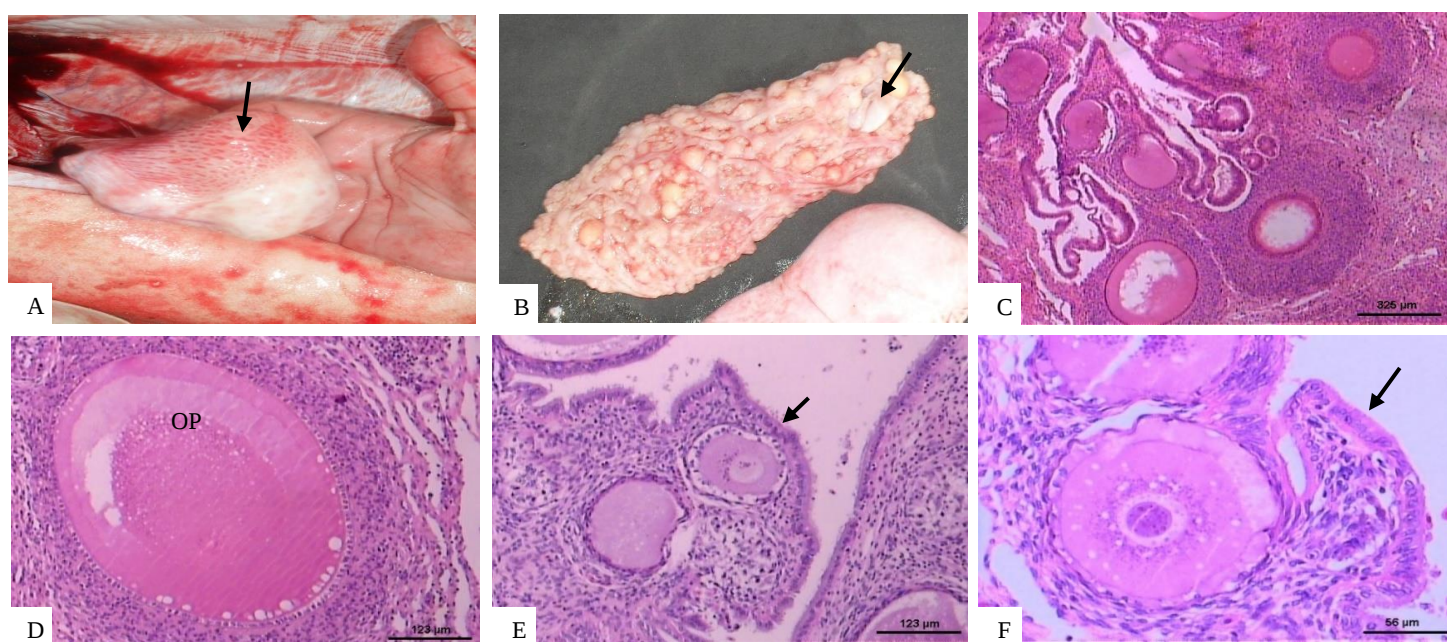


Figura 1. Fotos macroscópicas e microscópicas do ovário de tubarão lixa A) evidenciando ovário imaturo (SETA). B Ovário em desenvolvimento (SETA). C) Ovário em lóbulos com lotes ovígeros distintos. Coloração: H.E. D) Ovócito primário (OP). Coloração: H.E.; E) A variação observada no epitélio ovariano. Coloração: H.E. F) Ao redor dos ovócitos o epitélio cúbico colunar estava delgado (SETA). Coloração: H.E.

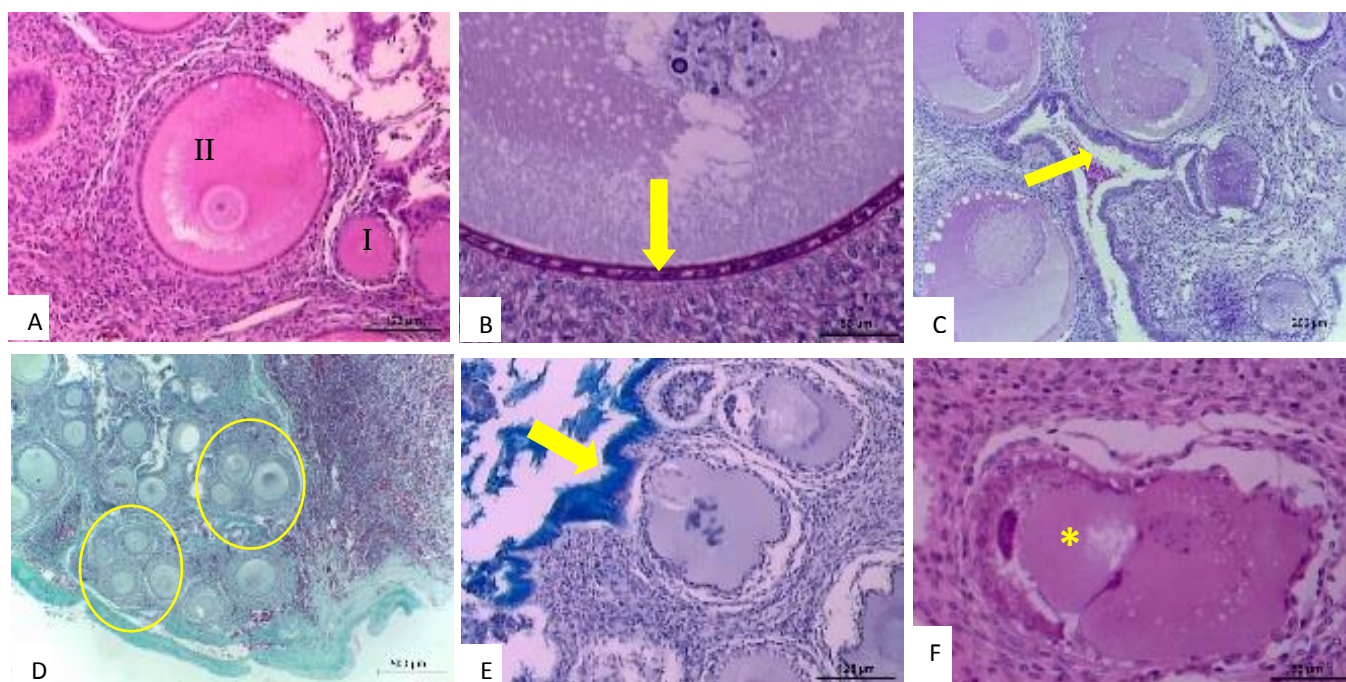


Figura 2. Fotomicrografias do ovário de tubarão lixa A) Ovócito no início da vitelogênese I e II. Coloração: H.E. B) Camada de glicoproteína envolvendo a membrana ovocitária e a teca são facilmente visíveis (SETA). Coloração: PAS. C) Epitélio simples variando de colunar a cúbico (SETA). Coloração: H.E. D) Lotes ovíferos formados pelos septos incompletos de tecido conjuntivo (Circulados). Coloração: Tricômico de Gomori. E) As células do epitélio ovariano apresentaram reatividade para o azul de Alcian pH 2,5% (SETA). Coloração: azul de Alcian 2,5%. F) Folículo atrésico (asterisco). Coloração: H.E.

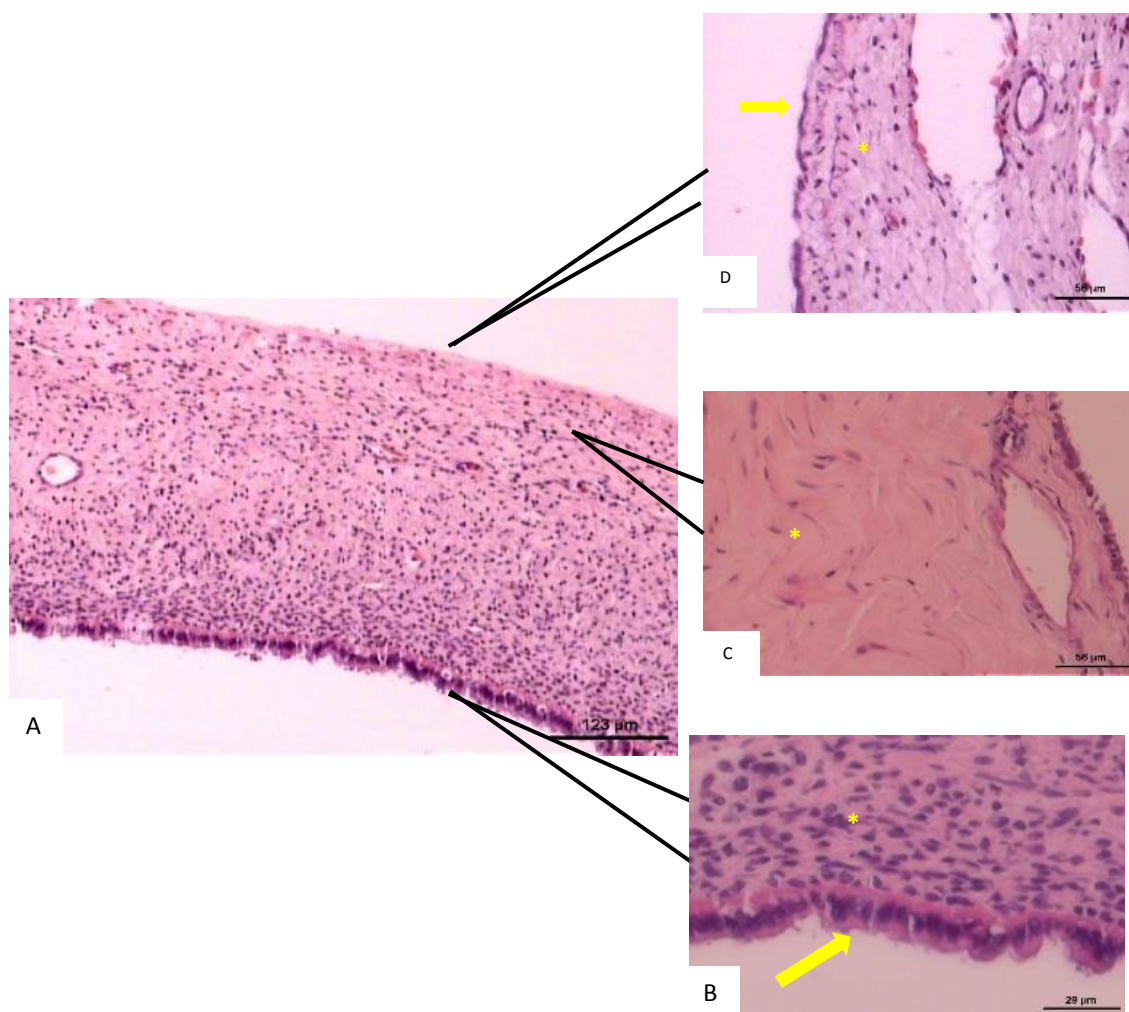


Figura 3. Fotomicrografias do útero de tubarão lixa. A) evidenciando as três camadas uterinas. B) Mucosa uterina. Epitélio simples colunar (SETA) e tecido conjuntivo frouxo (asterisco). C) Camada muscular, músculo liso (asterisco). D) Camada Serosa. Seta indicando epitélio simples e asterisco indicando tecido conjuntivo. Coloração. HE.

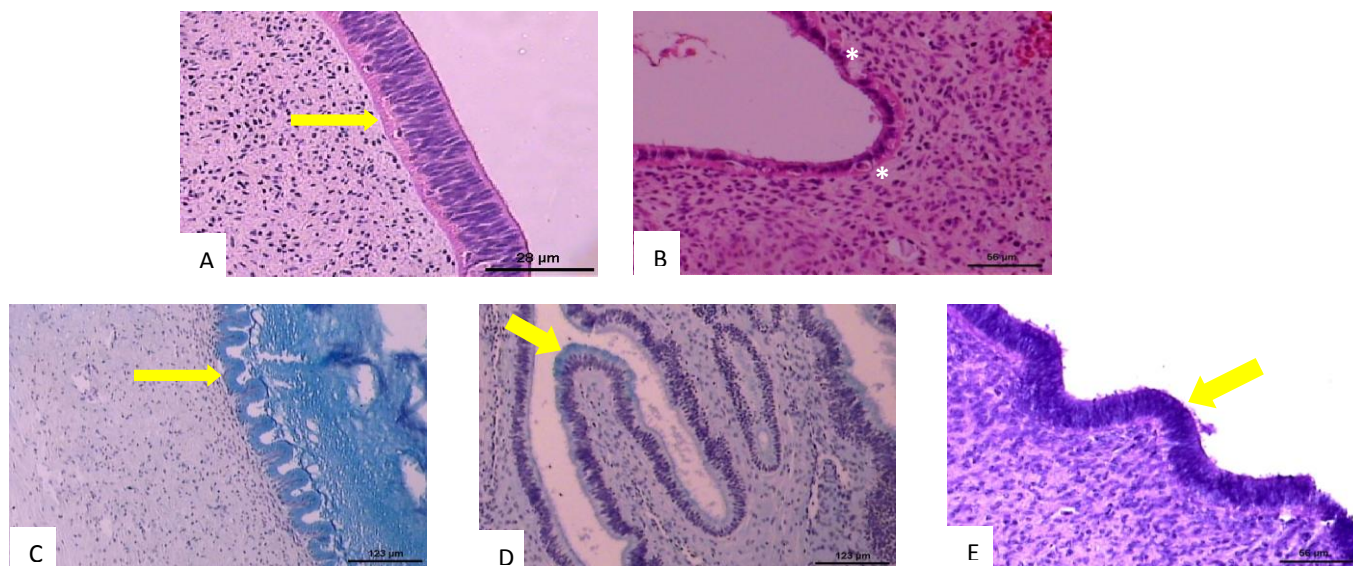


Figura. 4- Fotomicrografia do útero de tubarão lixa: A- Camada acelular (SETA). Coloração: PAS. B- Presença de vascularização no epitélio (Asterisco). Coloração: HE. C- Evidenciando invaginações na base do epitélio estratificado caracterizando oviduto. Coloração: azul de Alcian 2,5%. D- Oviduto, com invaginações no epitélio (SETA). Coloração: Tricromico de Gomori. E- Evidenciando pequenas projeções papiliformes do epitélio estratificado (SETA). Coloração: HE.

2º artigo- **Caracterização morfológica e espermatogênica do testículo do tubarão lixa *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788).** (Submetido no Zoomorphology)

Resumo

Este estudo relata uma nova forma de desenvolvimento testicular em tubarões lixa (*Ginglymostoma cirratum*) e evidenciando a primeira descrição histológica da espermatogênese nesta espécie. Com testículos do tipo radial, se desenvolve no sentido caudal para o sentido cranial, um padrão que parece ser único entre as espécies de tubarões. Os testículos imaturos apresentaram espermatogônias e células de Sertoli, enquanto os testículos no estágio capaz de reproduzir, os núcleos de células de Sertoli foram evidentes em posições basais dos túbulos seminíferos. O processo da espermatogênese vai da divisão das espermatogônias que formam espermatócitos primários, que vão se dividir em espermatócitos secundários, que por sua vez, vão se dividir e produzir espermátides e em seguida, passam para a periferia dos túbulos seminíferos. Posteriormente, os cistos com espermátides que foram observados em diferentes estágios de maturação, se dividem e se tornam espermatozóides. Na fase final da espermatogênese, foi observado que espermatozóides tinham a cabeça voltada para a membrana basal e flagelos dirigido para o lúmen. Faz-se necessário um estudo mais aprofundado dos testículos em uma ampla gama de espécies de tubarões, para que possamos futuramente determinar se esta nova forma de desenvolvimento dos testículos observado em tubarões lixa é compartilhada por outras espécies de elasmobrânquios.

Palavra-chave: Reprodução; Elasmobrânquios; Histologia

Characterization of testicular morphology and spermatogenesis in the nurse sharks *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788)

Mariana G. Rêgo^{1,2*}, Fábio H. V. Hazin¹, Joaquim Evêncio-Neto²

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Oceanografia Pesqueira, rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP:52.171-900. Fone: 55-81-33206510 /55-81-33206516/Fax: 55-81-33206512;

mari_rego03@hotmail.com

² 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: 55-81-33206387; evencio@dmfa.ufrpe.br;

* Corresponding author

Abstract

This study reports a novel form of testicular development in nurse sharks (*Ginglymostoma cirratum*) and provides the first histological description of spermatogenesis in this species. Radially structured testes developed from the caudal to the cranial regions, a pattern that appears to be unique among shark species. Testes from immature males had spermatogonia and Sertoli cells, while in testes of developing and capable to reproduce males the nuclei of Sertoli cells were evident in basal positions of seminiferous tubules. The spermatogonia divide to form primary spermatocytes, secondary spermatocytes divide to produce spermatids and spermatids then move to the periphery of the seminiferous tubule. Subsequently, the cysts with spermatids were observed at different stages of maturation and spermatids became spermatozoa. In the final stage of spermatogenesis, spermatozoa had their heads directed towards the basal membrane and flagella directed towards the lumen. Examinations of testes development in a broad range of shark species is now required to determine if this novel form of testes development observed in nurse sharks is shared by other elasmobranch species.

Keyword: Reproduction; Elasmobranchs; Histology

INTRODUCTION

The elasmobranchs testis, which serves both spermatogenic and steroidogenic functions, is characterized by three structural types: diametric, radial and compound (Pratt 1988). Diametric testes, where the germinal zone extends along the distolateral surface of the testes and follicles develop from across the diameter of the testis, are found in the families Carcharhinidae (requiem sharks) and Sphyrnidae (hammerhead sharks). In contrast, in radial testes, which are found in large oceanic sharks in the families Lamnidae (mackerel sharks) and Alopiidae (thresher sharks), the germinal zone is located centrally and follicles develop radially from the center of the testes toward the circumference. Finally, compound testes, which are found in the family Rajidae (skates), are a combination of radial and diametric forms of testes development. However, within these elasmobranch testes structural types, detailed histological examinations of testes and spermatocyte development have only been performed in a handful of species (Hamlett 1999). Therefore, there is currently limited understanding of testes and spermatocyte development in the vast majority of elasmobranchs.

In contrast to the variation in structural types of testes, it remains unclear if elasmobranchs also exhibit variation in patterns of testes development. In some shark species, testes emanate from the anterior (cranial) surface of the epigonal organ (Carrier 2004). For example, in a detailed study of testes development in the basking shark (*Cetorhinus maximus*), Matthews (1950) observed that only the epigonal organ was present in the caudal portion and most of the testicular tissue was found in the cranial portion in adult sharks. Cranial to caudal testes development suggests that testes begin development in the anterior (cranial) portion of the epigonal organ and during maturation extend caudally. However, it remains unclear if the cranial to caudal development of

testes in the epigonal organ represents a common feature of elasmobranch reproductive development.

This study performs a macroscopic and microscopic characterization of testes and spermatogenesis in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre 1788). Nurse sharks are a coastal species found in tropical and subtropical waters of continental and insular shelves (Cervigón and Alcalá 1999, Compagno 2005). The nurse shark is the only member of the family Ginglymostomatidae, and recent phylogenetic hypotheses suggest that nurse sharks are an evolutionarily distinct elasmobranch family (Velez-Zuazo and Agnarsson 2011). Very little is known about the reproductive development and morphology of nurse sharks, although Castro (2000) describes some details about the reproductive biology of this animal . Obtaining information on nurse shark reproductive biology would assist with the species management in light of ongoing threats to their populations. The nurse shark is prized in competitions by spear-fishers and taken as bycatch in coastal fisheries using gillnets and longlines for its meat, fins, liver oil and skin (Gibson et al. 2006). Preliminary studies on its biology indicate a strong site fidelity, which renders nurse sharks vulnerable to local extirpation from overexploitation (Compagno 2001). For example, the western Atlantic populations of the species is regarded as vulnerable off the cost of South America, where population reduction and localized extinctions have been reported as a result of unmanaged coastal fisheries and commercial aquarium fisheries (Gruber and Sundström, 2000; Rosa et al. 2005).

The present study provides a novel investigation of testes development and spermatogenesis in nurse sharks and provides evidence of a differentiated morphology development feature that has never been described before.

MATERIAL AND METHODS

Sampling area

Sixteen nurse shark specimens were collected at the port of Mucuripe, Fortaleza/ CE (lat: 03°43'00''S; long: 038°28'07''W), from September 2012 to June 2013. Using IUCN Red List criteria, nurse sharks were listed as Vulnerable in Brazil and consequently included in the Official List of Endangered Animals. None of the nurse sharks examined in this work were, therefore, caught for this purpose. They were obtained from regular landings by artisanal fishing boats, at the port of Mucuripe, where they are sold freely, representing from 15% to 20% of annual shark landings (Arthaud 1999). Prior to their sale, male total length (TL), pre-caudal length (PCL), and clasper length were measured (in cm) and claspers were classified by their degree of calcification. Following evisceration by the fishers, testes were sampled and then fixed in neutral buffered 10 % formalin.

Macroscopic description and characterization of the testes

Testes were weighed (g), measured for length and width (cm), and macroscopic maturity stage was determined according to the stages proposed by ICES (2013). Males were classified based on a five-point developmental stage criteria as immature, developing, capable to reproduce, active or regressing. Immature males (stage I) had flexible, non-calcified claspers (usually shorter than the pelvic fins) and straight, thread-like testes with small, underdeveloped ducts. Developing (stage II) males had flexible, partially calcified claspers as long or longer than the pelvic fins and the initial stages of testes development, with segments emerging and ducts developing and beginning to coil. Males capable to reproduce (stage IIIa) had rigid, fully calcified claspers that were longer than the pelvic fins and fully developed testes with fully segmented ducts that were tightly coiled and

filled with sperm. Active males (stage IIIb) had claspers and testes similar to stage IIIa males but with clasper glands dilated and sometimes swollen and often with sperm present in the clasper groove or glands and sperm observed inside ducts or flowing out of the cloaca when pressure was applied. Regressing males (stage IV) had fully formed claspers similar to stage IIIa but shrunken and flaccid testes empty sperm ducts and seminal vesicles, and no sperm flowing from the cloaca following the application of pressure. Active and regressing males were not observed.

Histological characterization of the testes

After 24 hours of formalin fixation, testes were cleaved and re-fixed in 10% formalin for another 24 hours, and then transferred to 70% ethanol. Subsequently, the samples were sent to the Federal Rural University of Pernambuco, where the histological process was done. For this purpose, the sections were then dehydrated in ethanol with increasing concentrations, from 80% to 100%, diaphanized in butyl alcohol, impregnated and embedded in paraplast. The paraplast blocks were then cut using the rotatory Minot (Leica) Microtome, adjusted to 5 micrometers (μm), with the sections being then placed on slides, which were kept in the incubator at 37 °C for 24 hours for drying and bonding. The sections were then stained with hematoxylin/ eosin- phloxine and gomori trichrome.

Images of histological sections were captured using a Pannoramic 250 Flash II scanner (3DHISTECH Ltd., Hungary). Images were examined using the Pannoramic Viewer program (3DHISTECH Ltd., Hungary) in order to identify these cell development stages during spermatogenesis.

RESULTS

The 16 male nurse sharks examined were immature (10), developing (3) and capable to reproduce (3) (Table 1).

Testes development: macro- and microscopic characterization

Nurse shark testes develop from the caudal to the cranial regions (Fig.1A). They are radially structured, with the germinal zone in the center (Fig. 1C and 1D) of the developing seminiferous tubules that extended to the periphery, where the efferent ducts collect the sperm as it matures (Fig.1B). In all developmental stages the epigonal organ surrounded the entire testicle.

Total body and testes length was smallest in immature males and largest in capable to reproduce males (Table 1). In immature males, the testis was undifferentiated from the epigonal organ, slender and whitish (Fig. 2A). In developing males, testis were more developed, starting to get thicker and became more pronounced in the caudal portion the testis (Fig. 2B). More advanced testes development, when they could then be differentiated from the surface of the epigonal organ, began only above 150 cm in total length. In capable to reproduce males, testis were thicker and reddish, becoming visibly more vascularized (Fig. 2C). Both macroscopic and microscopic analyses in these males revealed that the testicular portion was much larger in the cranial pole compared with immature and developing males (Fig. 1A).

In immature males the majority of the testis was made up of the epigonal organ and only a small portion showed the presence of spermatogonia on a larger scale and Sertoli cells (Fig.2D, 2G). The cranial pole of the testis consisted solely of the epigonal organ, while small portion of testes were evident in the caudal pole. In developing males,

spermatocytes and spermatids were present in the testes, being present, however, only in a small portion of the cranial pole (Fig. 2E, 2H). In capable to reproduce males, testes were rich in sperm and Sertoli cells were present (Fig. 2F, 2I). At this stage, it was possible to observe sperm within the seminiferous tubules, with the heads directed to the basal membrane and the tails towards the lumen. The mature testes of nurse sharks showed an albuginea tunica composed of dense connective tissue with the testicular stroma composed of loose connective tissue.

Characterization of the spermatogenesis

In immature males, spermatogonia and Sertoli cells were present in testes, while all stages of spermatogenesis were observed in the testes of developing and capable to reproduce males. For developing and capable to reproduce males, the nuclei of Sertoli cells were evident in basal positions of seminiferous tubules (Fig. 3A-F). Secondary spermatocytes divide to produce spermatids, which are distributed amongst the seminiferous tubule (Fig. 3B). Spermatids then move to the periphery of the seminiferous tubule (Fig. 3C) and begin to clump (Fig. 3D) and elongate (Fig. 3E). Cysts with spermatids were observed at different stages of maturation. Spermatids type I contained round cells with spherical nuclei (Fig. 3B). In type II spermatids, they had an oval to pear shaped nucleus (Fig. 3C). The type III were grouped into loose bunches with the head embedded in Sertoli cells (Fig. 3D). Basophilic heads were directed towards the basal membrane and the flagella were oriented towards the lumen (Fig. 3D-E). Spermatids (type III) then differentiate into spermatozoa, which were grouped in compact packages, with Sertoli cells with their heads directed towards the basal membrane and flagella directed towards the lumen (Fig. 3F).

DISCUSSION

A novel caudal to cranial form of testicular development is described in the nurse shark. This pattern of development appears to be unique among sharks, as testes development typically takes place in the cranial caudal direction (e.g. Matthews 1950). By examining sections along the testis it was clear that the cranial portion contained only the epigonal organ and the testicular tissue was present in the caudal portion. In immature and developing males, the epigonal organ was the only structure present in the cranial portion, while a small testicular region was found in the caudal portion. Only among capable to reproduce males did the cranial portion of the testes also contained testicular tissue. According to Matthews (1950), testis development in *Cetorhinus maximus* occurs cranial to caudal, which differs entirely from the pattern of development in nurse sharks observed in this study. Such a caudal to cranial testes developmental pattern has not been described in any other shark species, and may reflect either a unique feature of nurse shark development or the result of incomplete taxonomic sampling of testes development in sharks.

Nurse sharks exhibited radial testes development, with a germinal zone in the center of development of the seminiferous follicles. This developmental type is found in Lamniformes sharks (Pratt 1988; Carrier *et al.* 2004) but has not yet been described in Ginglymostomatidae. The epigonal organ was present around the length of the testes in the nurse sharks examined, in keeping with the placement of epigonal organs observed in other shark species (Girard 2000). Similarly, the placement of the germinal zone, near the center of the testes, observed in nurse sharks in this study is similar to that of other shark species (Pratt 1988).

Testes development and spermatogenesis are dependent on male maturation stage. In immature males the epigonal organ was long and irregular, with no known reproductive function other than to support the testes. Spermatids or spermatozoa were not detected in immature nurse shark males, indicating that these males were far from reproductively competent. Spermatids and spermatozoa were also absent in testes of immature narrow smooth-hound sharks, *Mustelus schmitti* (Rojas 2003). However, in *Centrophorus squamosus* (Girard et al. 2000), *Mustelus manazo* and *Mustelus griseus* (Teshima 1981), cysts with spermatids and sperm have been described in immature males. Developing and capable to reproduce male nurse sharks exhibited a dramatic increase in testes and sperm ducts size, which is characteristic of testes development in sharks (Carrier et al. 2004). Capable to reproduce male nurse sharks had broad and rounded testes, often reddish, and filled with sperm fluid.

Several stages of spermatogenesis were observed in nurse sharks. Seminiferous tubules, containing secondary spermatogocytes with Sertoli cell nuclei lining the lumen, or migrating to the basement membrane, were observed near the dorso-lateral wall of the testis. During spermatogenesis, there were four distinct zones of spermatocysts, containing primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa. During spermatogenesis, three types of spermatids were discerned: in the first one, nuclei of spermatids were round and smaller than those of secondary spermatocytes; in the second, spermatids possessed elliptical nuclei; in the third, bundles of spermatids were observed. At the distal outer part of the testis, spermatocysts with spermatozoa preceded a degenerating area with empty spermatocysts. The same sequence of spermatogenesis was observed in *Centroscymnus coelolepis* and in *Centrophorus squamosus* (Roosen-Runge 1977; Girard 2000; Conrath 2004). Similarly, the location of

the spermatozoa head (directed towards the basal membrane) and flagella (directed towards the lumen) and the spiral shape of these structures in nurse sharks were similar to spermatozoa location and shape in other shark species (Metten 1939; Teshima 1981).

In conclusion, this study reports a novel caudal to cranial form of testicular development in nurse sharks and provides the first histological description of spermatogenesis in this species. In adult sharks, testes usually vary greatly in size during the year, enlarging and swelling during the breeding season, and regressing at other times (Carrier et al. 2004). Therefore, an examination of seasonal impacts on testes development accompanied by histomorphometrics descriptions of testes characteristics would further our understanding of nurse shark reproductive biology. However, given the conservation status of nurse sharks any future work on this species that necessitates destructive sampling is not recommended. Finally, future examinations of testes development in sharks, particularly the direction that the testis develops, is required to determine if caudal to cranial testicular development is unique to nurse sharks or shared by other elasmobranch species.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CAPES for the PhD sandwich financial support, FACEPE for funding the PhD scholarship over the years, Roger Meadows and the Bio-Imaging Facility staff at the University of Manchester for assistance in collecting histological images, and the University of Manchester for support.

REFERENCES

Arthaud IDB (1999) Fauna de tubarões alvo da pesca artesanal na praia de Mucuripe, Fortaleza—CE (Chondrichthyes, Elasmobranchii). BSc Monograph. Federal University of Ceara ´—UFC Fortaleza, Brazil

- 253 Bass AJ, D'aubrey JD, Kitanasamy N (1975) Sharks of the east coast of southern
254 Africa. III. The families Carcharhinidae (excluding *Mustelus* and *Carcharhinus*) and
255 Sphyrnidae. Invest. Rep. Oceanogr. Res.Inst., 33: 1-100
- 256 Carrier JC, Pratt Jr HL, Castro JI (2004) Elasmobranch Reproduction. Pp.269-286. In:
257 J.C. Carrier JA, Musick, M.R. Heithaus (Eds.). Biology of Sharks and Their Relatives.
258 Boca Raton, CRC Press: Boca Raton, FL
- 259 Castro JI (2000) The biology of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, off the
260 Florida East Coast and the Bahama Islands. Environmental Biology of Fishes 58, 1–22
- 261 Cervigón F, Alcalá A (1999) Los peces marinos de Venezuela. Vol. 5. Tiburones y
262 Rayas. Fundación Museo del Mar
- 263 Clark E, Von Schmidt K (1965) Sharks of the Central Gulf coast of Florida. Bulletin of
264 Marine Science. 15: 13-83
- 265 Compagno LJV (2001) FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. Vol 2: Sharks of
266 the World: Bullhead, mackeral and capret sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and
267 Orectolobiformes. FAO, Rome
- 268 Compagno LJV, Ando M, Fowler S (2005) Sharks of the world. Princeton: Princeton
269 University Press
- 270 Conrath CL (2004) Chapter 7. Reproductive biology. Pp. 133–164. In: Elasmobranch
271 Fisheries Management Techniques. Singapore
- 272 Dodd JM (1983) Reproduction in cartilaginous fishes (Chondrichthyes). Pp. 31-95. In:
273 Fish Physiology, Vol. IX – Reproduction, Part A – Endocrine Tissues and Hormones
274 (W.S. Hoar, D.J. Randall & E.M. Donaldson (Eds.). New York, Academic Press, 483p
- 275 Girard M, Rivalan P, Siquin G (2000) Testes and sperm morphology in two deep-
276 water squaloid sharks, *Centroscyrnus ceololepis* and *Centrophorus squamosus*. J
277 Fish Biol 57: 1575-1589

- 278 Gibson C, Valenti SV, Fowler SL, Fordham, SV (2006) The Conservation Status of
 279 Northeast Atlantic Chondrichthyans; Report of the IUCN Shark Specialist Group
 280 Northeast Atlantic Regional Red List Workshop. VIII + 76pp. IUCN SSC Shark
 281 Specialist Group
- 282 Gruber S, Sundström LF (2000) *Negaprion brevirostris*. In IUCN 2007. 2007 IUCN Red
 283 List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Accessed on 14 December 2007
- 284 Hamlett WC, Koob T (1999) Female reproductive system. Pp. 398-443. In W. C.
 285 Hamlett (ed.), *Sharks, Skates and Rays: The Biology of Elasmobranchs Fishes*. Johns
 286 Hopkins University Press, Baltimore, Maryland
- 287 Hamlett WC (2007) The Testis and Spermatogenesis. Pp. 171- 200. In: K.B. Engel &
 288 G.V. Callard (Eds.). *Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks,*
 289 *batoids, and chimaeras*. Vol. 3. Inc. Enfield (NH), USA. Science Publishers. 562p
- 290 ICES (2013) Report of the workshop on Sexual Maturity Staging of Elasmobranchs
 291 (WKMSSEL), 11-14 December 2012, Lisbon, Portugal. ICES CM 2012/ACOM:59. 66
 292 pp
- 293 Matthews LH (1950) Reproduction in the basking shark, *Cetorhinus maximus*
 294 (Gunner). *Phil. Trans. Roy. Soc. Land. Ser. B. Biol. Sci.* 234: 247-316
- 295 Mellinger J (1965) Stades de la spermatogenesechez *Scyliorhinus caniculus*:
 296 description,données histochimiques, variations normales et expérimentales. *Zeitschrift*
 297 *für Zellforschung*, 67: 653-673
- 298 Metten H (1939) Studies on the reproduction of the dogfish. *Philosophical Transactions*
 299 *Royal Society Series B*, 230: 217-238
- 300 Parsons GR, Grier HJ (1992) Seasonal changes in shark testicular structure and
 301 spermatogenesis. *Journal of Experimental Zoology*, 261:173-184

- 302 Pratt HL Jr (1979) Reproduction in the Blue shark, *Prionace glauca*. Fishery Bulletin
303 77, 445–470
- 304 Pratt HL Jr (1988) Elasmobranch gonad structure a description and survey. Copeia,
305 1988: 719–729
- 306 Rojas FO (2013) Testicular histology of *Mustelus schmitti* springer, 1939
307 (elasmobranchii, triakidae). BioScriba Vol. 6(1) 16-32. Septiembre 2013
- 308 Roosen-Runge E (1977) The process of spermatogenesis in animals. London,
309 Cambridge University Press, p214
- 310 Rosa RS, Castro ALF, Furtado M, Monzini J, Grubbs RD (2005) *Ginglymostoma*
311 *cirratum*. In IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species.
312 <www.iucnredlist.org>. Accessed on 14 December 2007
- 313 Stanley HP (1966) The structure and development of the seminiferous follicle in
314 *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). Zeitschrift für
315 Zellforschung, 75: 453–468
- 316 Stevens JD, McLoughlin KJ (1991) Distribution, size and sex composition, reproductive
317 biology and diet of the shark from northern Australia. Australian Journal of Marine and
318 Freshwater Research. 42: 151- 199
- 319 Teshima K (1981) Studies on the reproduction of Japanese dogfishes, *Mustelus manazo*
320 and *M. griseus*. Journal of the Shimonoseki University of Fisheries, 29: 113-199
- 321 Watson G, Smale MJ (1998) Reproductive biology of shortnose spiny dogfish, *Squalus*
322 *megalops*, from the Agulhas Bank, South Africa. Marine and Freshwater Research.
323 Doi:10.1071/MF97255

Table 1. Mean $\pm$ SE male body and testes length of nurse shark specimens based on maturity stages. Sample sizes (n) are indicated for each maturity stage. Length ranges are presented in brackets.

Maturity stage	n	Total body length (cm)	Testes Length (cm)
Immature	10	126.6 $\pm$ 7.2 (91 – 165)	2.45 $\pm$ 0.24 (1.0 – 3.0)
Developing	3	171.0 $\pm$ 4.0 (163 – 175)	3.0 (3.0)
Capable to reproduce	3	243.3 $\pm$ 18.0 (209 – 270)	5.77 $\pm$ 1.18 (4.0 – 8.0)

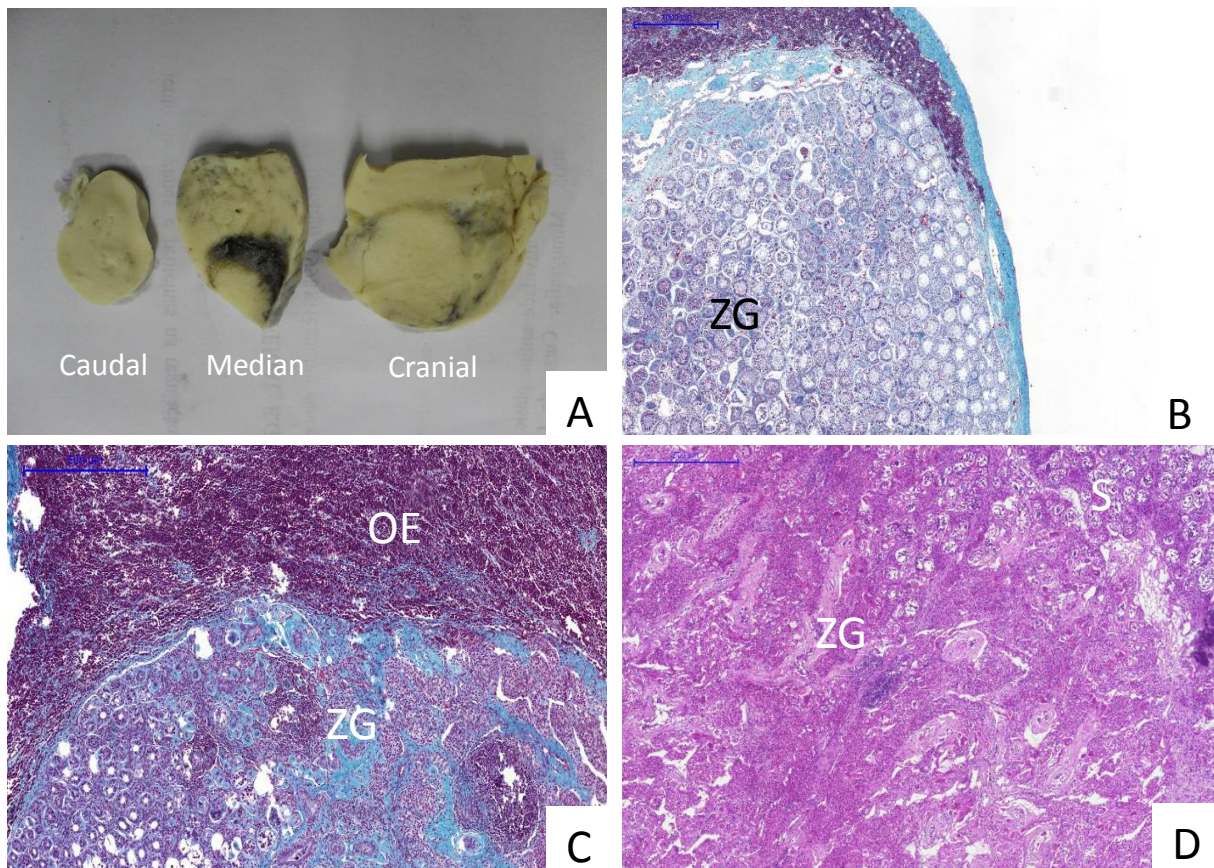


Fig. 1. Macroscopic and photomicrographic images of the nurse shark testes. **A-** Testes of a capable to reproduce male demonstrating caudal to cranial development. **B-** Maturing testis, characterizing the radial type testis showing the germinal zone (ZG), staining: Gomori Trichrome. **C-** Germinal zone (ZG) and epigonal organ (OE). staining: Gomori Trichrome. **D-** Germinal zone and Spermatocyst (S), staining: HE.

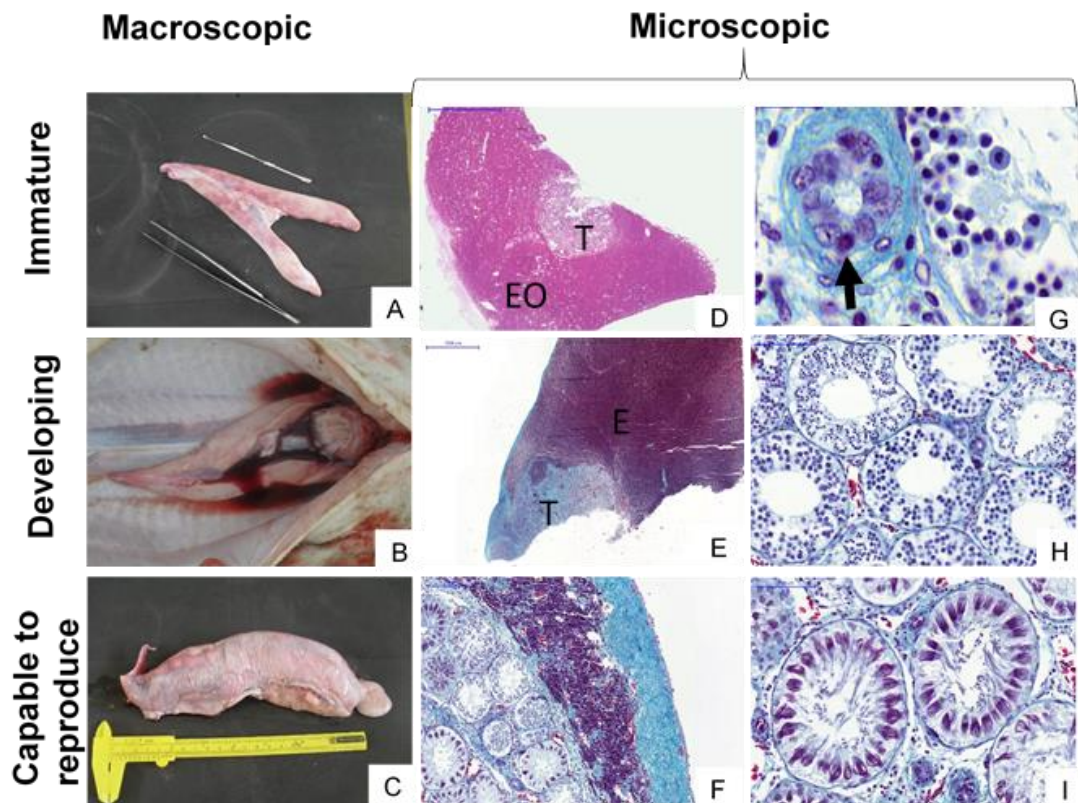


Fig. 2. Macroscopic and photomicrographic images of the nurse shark testes. Macroscopic images of **A**- immature **B**- developing and **C** - capable to reproduce testes. Microscopic images of **D**- immature (staining: HE), **E**- developing (staining: Gomori Trichrome), and **F**- capable to reproduce testes (staining: Gomori Trichrome). **G**- Spermatogonia (black arrow) and sertoli cell in an immature testes (staining: Gomori Trichrome). **H**- Seminiferous tubules with spermatids in the cranial pole of developing male testes (staining: Gomori Trichrome). **I**- Spermatozoa and sertoli cells in capable to reproduce testes (staining: Gomori Trichrome).

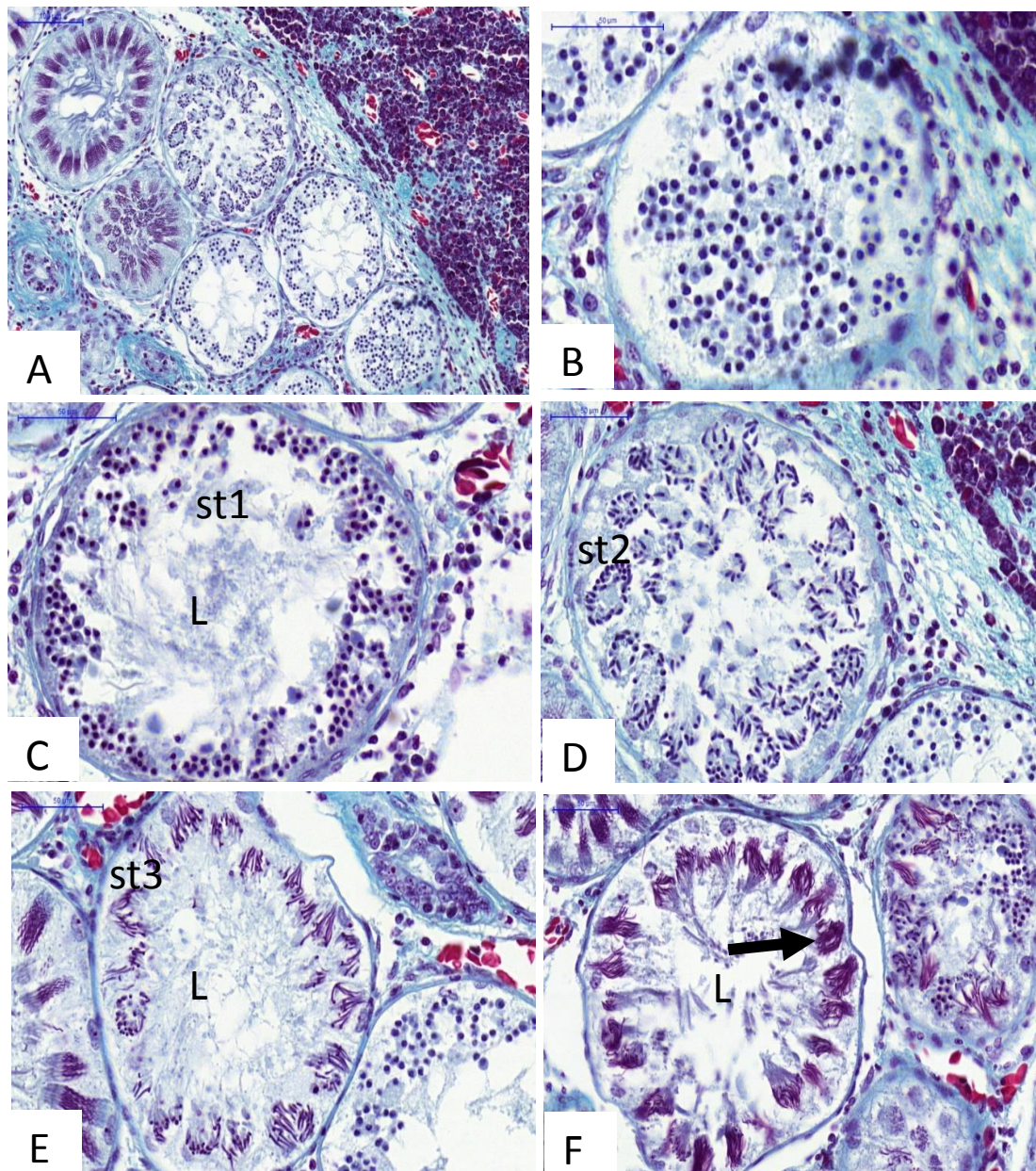


Fig 3. Photomicrography of division of the testes of the nurse shark: A- Spermatogenesis stages from spermatocytes into spermatozoa. B- The secondary spermatocytes (arrow) by meiosis will form the primary spermatids. C- Spermatids (st1) grouped round the periphery (arrow) and continuing to divide by meiosis. D – Spermatids (st2) beginning to elongate to form the heads of the spermatozoa and begins to form clump. E- Transformation of spermatids (st3) into spermatozoa. F- Spermatozoa being visible, the spiral shape is beginning to appear at the bases of the heads and large Sertoli cells (arrow). Staining: Gomori Trichrome.

3º artigo- A comparação da morfologia e histomorfométrica de cisto espermato gênico de três espécies de tubarões com testículos diamétricos.
(Submetido Journal Fish Biology)

Resumo

Elasmobrânquios exibem três tipos de desenvolvimento testicular: diamético, radial e composto. As três espécies deste estudo possuem o tipo de testículo diamétrico. Para todas as espécies, o testículo se desenvolve da porção cranial para a porção caudal. *P. glauca* e *R. lalandii* foram observados todas as etapas da espermatogênese. Porém, para *M. canis* não foi observado todas as células de espermatogênese em animais nos primeiros estágios de maturação. O número de células de Sertoli de ambas as espécies aumentou com o desenvolvimento das células por seis vezes em *R. lalandii* e menos do que quatro vezes em *P. glauca*. Foram observados entre *P. glauca* e *R. lalandii* diferenças estatísticas de diâmetro cisto (ANOVA $F = 10,422$; $p = 0,00145$) e números de células de Sertoli ($p = 0,026$ ANOVA $F = 4,979$). Número de células Sertoli foram estatisticamente diferentes nos estágios de cistos na espermatogênese de *P. glauca* (KW, $H = 28,62$, $p = 0,000$) e *R. lalandii* (KW, $H = 58,289$, $p = 0,000$). Foi observado neste estudo, um aumento do diâmetro celular do espermátócito II na espécie *R. lalandii*, porém este aspecto não é comum entre espécies de elasmobrânquios, em comparação, por exemplo com *P. glauca*. Este aspecto deve ser investigado. Procurando por respostas do porque esta espécie possui um aumento específico nesta fase da espermatogênese.

Palavra-chave: Elasmobrânquios; Morfologia; Histologia

Comparison of the morphology and histomorphometry of spermatogenic cyst of three sharks species with diametric testes

Mariana G. Rêgo^{1,2*}, Fábio H. V. Hazin¹, Joaquim Evêncio Neto².

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Oceanografia Pesqueira, rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP:52.171-900. Fone: 55-81-33206510 /55-81-33206516/Fax: 55-81-33206512; mari_rego03@hotmail.com

² 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; evencio@dmfa.ufrpe.br;

* Correspondence

Abstract

Elasmobranchs show three types of structural development of the testes: diametric, radial and compound. In the three species in this study, testis development proceeded from the cranial to the caudal region, characterizing the type of diametric testis. The diametric spermatogenesis development was observed for *P. glauca*, *R. lalandii* and *M. canis*, with the seminiferous cysts following from the cranial wall along the testes perimeter to the caudal wall, where efferent ducts collect the spermatozoa. All stages of spermatogenesis were observed in *P. glauca* and *R. lalandii*. Nonetheless, for *M. canis* samples were composed by animals in the early stages of maturation, and for this reason neither all the spermatogenesis cells lineage were not present. The number of Sertoli cells in both species increased with cell development by six times in *R.lalandii* and less than four times in *P. glauca*. Statistical differences in cyst diameter (ANOVA F= 10.422; p= 0.00145) and Sertoli cell numbers (ANOVA F=4.979; p=0.026) were observed between *P. glauca* and *R. lalandii*. Sertoli cell numbers were statistically different within stages of spermatogenesis cysts to *P. glauca* (KW, H=28.62, p=0.000) and *R. lalandii* (KW, H=58.289, p=36 0.000). The increase of spermatocyte II cell diameter described for *R. lalandii* in this study was not usual to elasmobranch species as compared, for example, to

P. glauca. This aspect should be further investigated, to answer why *R. lalandii* has a distinct diameter increase at this stage of spermatogenesis.

Keyword: Elasmobranchs; Morphology; Histology

INTRODUCTION

The key phylogenetic position of elasmobranchs, which are the first internally fertilizing and oldest jawed vertebrates, offers unique insights into the evolutionary origins of reproductive traits. In recent years, the reproductive anatomy and physiology of elasmobranch testes have received increasing attention (Wourms, 1977; Pratt, 1988; Gallard *et al.*, 1989; Chatchavalvanich *et al.*, 2004; Serra-Pereira *et al.*, 2011; Hamlett, 2007). Elasmobranch testes are paired and closely related to hematopoietic epigonal organ. They are responsible for the production of spermatozoa (spermatogenesis) and steroid hormones (steroidogenesis). Elasmobranchs exhibit three types of structural development of the testes: diametric, radial and compound (Pratt, 1988). Within the testes, the spermatogenic unit is the spermatocyst, which is formed by a clone of isogenetic germ cells, enclosed by several Sertoli cells, which form the wall of the cyst (Wourms, 1977; Loir *et al.*, 1995). These cysts create different micro-environments where each stage of spermatogenesis can be observed, making elasmobranch testes ideal models for investigating germ cell and Sertoli cell interactions in the spermatogenic progression (Engel & Callard, 2007).

In the shark families Carcharhinidae (requiem sharks), Sphyrnidae (hammerhead sharks), Somniosidae (sleeper sharks), Centrophoridae (gulper sharks) and Triakidae (hound sharks), testes develop diametrically, from the ventral to dorsal surface of the epigonal organ (Pratt, 1988; Girard *et al.*, 2000; Rogers, 2013). In diametric development, spermatogenesis proceeds from one wall across the diameter of the testis

to the opposite wall, where efferent ducts collect the spermatozoa (Park *et al.*, 2013). In the ventral pheripheric area of the germinal zone, only spermatogonias cysts are present. The development of the seminiferous follicles proceeds from the germinal zone towards the opposite wall, where the spermatozoids cysts are located (Pratt, 1988; Girard *et al.*, 2000; Carrier *et al.*, 2004; Rogers, 2013).

However, although testicular structure and development have been described in several shark species, a robust description of the histomorphometrics of shark testes and comparisons of testes structures among species is not yet available. This paper describes the morphology and histomorphometry of diametric testes of three shark species, including the description of gross testicular and cellular morphology at each stage of maturation and the characterizationthe histomorphometrics of testes development. Finally, a comparison of seminiferous cystsdiameter and the number of Sertoli cells per cyst at different stages of maturation among three shark species with diametric testes is also provided.

MATERIAL AND METHODS

SAMPLING AREA

For this study 26 animals of 3 species (*Prionace glauca*, *Rhizoprionodon lalandii* and *Mustelus canis*) were collected between March 2012 and October 2013, in two different areas. Specimens of *P. glauca* (n=8), an oceanic species, were collected in the port of Recife- PE (lat: 8°03'22''S and long: 34°51'57'' W), after being caught during 4 fishing trips by long-liners that operate in oceanic waters of the South and Equatorial Atlantic Ocean, targeting tunas. *R. Lalandii* (n= 14), a small coastal shark, and *M. canis* (n= 4), a demersal species that inhabits continental and insular shelves to 200 m depth (Conrath and Musick, 2002), were sampled from artisanal fisheries landing in the port of

Mucuripe, Fortaleza- CE (lat: 03°43'00''S; long: 038°28'07''W). Therefore, samples were collected after the animal was sold and its viscera were removed. Each animal was measured for total length (TL) and pre-caudal length (PCL), in cm. The claspers were classified by their degree of calcification. Testes were fixed in neutral buffered 10% formalin solution.

DETERMINATION OF DEVELOPMENTAL STAGES

The male reproductive organs in all species consisted of a pair of testes attached by mesorchium in the peritoneal cavity. The determination of the macroscopic maturity stages, following ICES (2013), was based on five developmental stages: immature, developing, capable to reproduce, active or regressing. Active and regressing males, however, were not observed.

HISTOLOGICAL PROCESS

Testes were fixed in formalin for 24 hours. They were then cleaved and re-fixed in formalin for another 24 hours, and then transferred to 70% ethanol. Subsequently, the samples were sent to the Universidade Federal Rural de Pernambuco, where the histological process was done. To this aim, the sections were dehydrated in ethanol with increasing concentrations, from 80% to 100%, diaphanized in butyl alcohol, and finally impregnated and embedded in paraplast. The paraplast blocks were then cut using the rotatory Minot (Leica) Microtome, adjusted to 5 micrometers (μm), with the sections being then placed on slides, which were kept in the incubator at 37°C for 24 hours for drying and bonding. The sections were then stained with hematoxylin/ eosin-phloxine, gomori trichrome. Morphological images of the histological sections were done using a

Pannoramic 250 Flash II scanner (3DHISTECH Ltd., Hungary), while images were examined using the Pannoramic Viewer program (3DHISTECH Ltd., Hungary).

MORPHOMETRIC ANALYSIS

For species where “capable to reproduce” males were sampled (*R. lalandii* and *P. glauca*), five different cell types were determined: spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa, following Callard (1989). The diameter of rounded spermatocysts at each cellular stage was measured and the number of sertoli cells was quantified at each stage. Shapiro-Wilkinson test was conducted to test data normality ($\alpha=0.05$). The difference between *R. lalandii* and *P. glauca* was tested using ANOVA and Kruskal-Wallis test ($\alpha=0.05$). In spermatocytes I and II cysts, the cell diameter was measured in ten cells inside three different cysts. The rounded spermatocytes measured were then chosen by following the germinal zone to the marginal edge.

RESULTS

DESCRIPTION AND CHARACTERIZATION OF THE TESTES

The three species in this study exhibit paired functional testes with round shape, suspended at the anterior end of the coelom by mesorchium under the vertebral column. For all species, testes development proceeds from the cranial to caudal region of the testes. Lateral expansion of the testes increased with male development stage (Table 1).

Diametric development of spermatogenesis was observed for *P. glauca* (Fig. 1A), *R. lalandii* (Fig 2A) and *M. canis* (Fig 3A), with the seminiferous cysts following from the cranial wall along the testes perimeter to the caudal wall, where efferent ducts collect the spermatozoa. The testis wall is lined by albuginea tunic, which is formed by

connective tissue and where blood vessels are visible (Fig 4B). The thickness of albuginea tunic and wall vascularization increased with male development stage (Fig. 4B and D).

The germinal zone was present in all testicular development stages (immature, developing and capable to reproduce) of all the species examined. The recruitment of spermatogonia and Sertoli cells in the germinal zone to form the cysts was also identified in all three species: *P. glauca* (Fig 1A e 1B), *R. lalandii* (Fig 2A e 2B) and *M. canis* (Fig 3A e B).

Prionace glauca

The *P. glauca* males sampled (n= 8) were in the developing (n= 2) and capable to reproduce (n= 6) stages (Table 1).

Developing stage: The claspers of developing males were flexible, partially calcified, and the testes had thick walls and reddish color. Spermatogonia, spermatocytes, spermatids and Sertoli cells were visible (Fig. 1 C, D and E). The germinal zone and the spermatogenic cysts were observed in a small portion of the cranial pole, while in the caudal pole only the epigonal organ was present.

Capable to reproduce stage: Capable to reproduce males had calcified claspers, as well as thicker and more irrigated testes. All the spermatogenic lineage (spermatogonia, spermatocytes I, spermatocytes II, spermatids and spermatozoa) associated with Sertoli cells were present in the testes at this stage. The spermatozoa within the seminiferous cysts had the heads directed to the basal membrane and the tails towards the lumen (Fig. 1 F). The testicular portion of the cranial pole was greater than in the developing stage and some meiotic divisions of secondary spermatids becoming spermatozoa were evident. The testicular stroma was composed of loose connective tissue (Fig. 1 A),

while the albuginea tunica was made of dense connective tissue. The number of Sertoli cells and the seminiferous cysts diameter increased with the maturation of spermatogenic cells (Table 2).

Rhizoprionodon lalandii

The *R. lalandii* males sampled (n= 14) were immature (n= 6), developing (n= 5) and capable to reproduce (n= 3) (Table 1).

Immature stage: Immature males had slender testes with thin wall (Fig 4C). The claspers were flexible and uncalcified. In this stage, it was difficult to differentiate the testis from the epigonal organ macroscopically. The majority of the cranial pole of the testis was made up of the epigonal organ and only a small portion showed the presence of cysts with spermatogonia on a larger scale and Sertoli cells (Fig. 2B). In the caudal pole of the testis, only epigonal organ cells were present.

Developing stage: Developing males exhibited flexible and partially calcified claspers. The testis was three times larger than testis of immature males (Table 1), and had a reddish color in its surface due to increased vascularization. Spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa and Sertoli cells were present. Meiotic I and II divisions were observed in the cystis of developing males (Fig. 2C, D and E). No spermatogenic cysts were observed in the caudal pole.

Capable to reproduce stage: Capable to reproduce males had fully calcified claspers and testes with an increased albuginea tunica thickness and wall vascularization (Fig 4D), as well as a more intense reddish color. Both cranial and caudal poles were made up of testicular tissue. The Albuginea tunica was composed of dense connective tissue, with the testicular stroma made of loose connective tissue (Fig. 2A). The number of Sertoli cells and the seminiferous cysts diameter increased with the maturation of

spermatogenic cells (Table 2). Testes development was similar to that observed in *P. glauca*, where spermatozoa were positioned within the cysts with the heads directed to the basal membrane and the tails towards the lumen (Fig. 2F).

Mustelus canis

M. canis males sampled (n= 4) were immature (n= 2) and developing (n=2) (Table 1).

Immature stage: Immature males had flexible and uncalcified claspers. In this stage it was not possible to distinguish the testis from the epigonal organ due to the smooth texture and cream color of the surface. The majority of the structure was made up of the epigonal organ and only a small portion showed the presence of testicular components. Spermatogonia and Sertoli cells were present (Fig. 2B).

The cranial pole showed small portion of testes, with germinal zone fully developed. In the caudal pole just epigonal organ cells were visible.

Developing stage: Developing males had flexible and partially calcified claspers. The testes were 1.5 times larger than those of immature males and had a reddish surface (Table 1). The median portion of the testes already had testicular components present, but at caudal pole only epigonal organ cells were found. Spermatogonia, spermatocytes, spermatids and Sertoli cells were observed. Cyst with spermatozoa were not present. In some seminiferous cysts meiotic division and spermatids beginning to form clumps were observed (Fig.3C and D).

COMPARISON OF TESTES HISTOLOGY BETWEEN SPECIES

All stages of spermatogenesis were observed in *P. glauca* and *R. lalandii*. *P. glauca* showed a larger seminiferous cyst diameter in the five stages of spermatogenesis cell development and a larger number of Sertoli cells when compared to *R. lalandii* (Table

2). The number of Sertolli cells in both species increased with cell development by six times in *R.lalandii* and less than four times in *P. glauca*. Statistical differences in cyst diameter (KW=146.18; $p<0.0001$) and Sertoli cell numbers (KW=111.60; $p<0.0001$) were observed between *P. glauca* and *R. lalandiii* . Sertoli cell numbers were statistically different to *P. glauca* and *R. lalandiii* among stages of spermatogenesis cysts (Kuskal-Wallis; *P. glauca*: $H=28.62$; $p=0.000$; *R. lalandiii*: $H=58.289$; $p=0.000$). Significant differences in Sertoli cell numbers were detected in the following stages of development of cyst spermatogenesis (Table 3). In both *P. glauca* and *R. lalandiii* cyst diameter differed significantly among stages of spermatogenesis (Kuskal-Wallis; *P. glauca*: $H=61.69347$; $p=0.000$; *R. lalandiii*: $H=82.004$; $p=0.000$). Significant differences were detected in the following stages of cyst cell development (Table 4).

R. lalandii exhibited an uncommon increase of cell diameter between spermatocytes I and II (Table 2).

DISCUSSION

In the three sharks species examined in this study, spermatogenesis progresses diametrically from a restricted germinative zone at the cranial pole towards the caudal pole of the testes. Stanley (1966) described the seminiferous follicles development from germinal sites zone across the diameter of the testis toward the opposite wall, where the efferent ductules are present to receive spermatozoa. The pattern of spermatogenic development found in *P. glauca*, *R. lalandii* and *M. canis*, and described by Stanley (1966) in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata*, is classified as diametric development (Pratt, 1988). Diametric testicular development is characteristic of Carcharhinidae and Spnyrnidae testes. In the last ten years, testes of Triakidae (Rogers, 2013), Somniosidae, Centrophoridae (Girard *et al.*, 2000) and Hemiscyliidae (Kassab *et*

al., 2009) shark families have also been recognized to exhibit diametric type of development. In the present study *P. glauca* and *R. lalandii* are members of Carcharhinidae family and *M. canis* is member of Triakidae family.

The recruitment of spermatogonia and Sertoli cells to form the cysts were visualized in the germinal zone of testes in *P. glauca*, *R. lalandii* and *M. canis*. The pattern of recruitment observed in this study is similar to the process described by Loir *et al.* (1995), where the primary spermatogonia and Sertoli cells stay initially free within the interstitial tissue of the testis and becomes abducted by a basement membrane to form the spermatocyst (sensu Parsons & Grier, 1992). The spermatocysts containing many Sertoli cells, each being associated with a clone of germ cells, progress from the cranial to the caudal direction. Such cranial to caudal testicular development is common in species with both diametric and radial testicular development (e.g. Matthews, 1950), with the only known exception to this pattern being the nurse shark *Ginglymostoma cirratum* (Rêgo *et al.*, submitted).

Prionace glauca sampled in this study came from the South Atlantic Ocean, where the migration patterns of spermatogenic cells are not well established (Hazin and Lessa, 2005). Kotas *et al.* (2010) described the clone of germ cells associated with Sertoli cells to form spermatocysts in *P. glauca* caught in the western South Atlantic Ocean. The same pattern was observed in *P. glauca* from this study.

In *R. lalandii*, a small coastal shark, all development stages were found, probably because the entire life cycle of this species takes place in the continental shelf, where the artisanal fleet normally operates. *R. lalandii* testes are similar to those described for *R. terranova*, with an elongated and flattened shape at immature stages and subcylindrical and rounded format in capable to reproduce stage (Loefer and Sedberry, 2003). Except

for immature specimens, all *R. lalandii* in this study exhibited spermatocysts with spermatogonia, spermatocytes and spermatids.

Testes and spermatogenesis of *M. canis* have the same characteristic with other species in the same genus. Testis shape, the association of testis with the epigonal organ, the diametric model of testicular development, and spermatocyst composition in immature forms are similar to those described for *M. schmitti* (Rojas, 2013). In immature specimens no cell types other than spermatogonia and Sertoli cells were observed in *M. canis* in this study nor in the closely related *M. schmitti* (Rojas, 2013).

The testes of the three species examined in this study were supported at their posterior ends by the epigonal organ. The testes are surrounded by the epigonal organ in other species with diametric testes, including: *Chlamydoselachus anguineus*, *Hexanchus griseus*, *Squatina dumeril* and *Heterodontus portusjackson* (Pratt, 1988). Girard *et al.* (2000) observed that no lympho-myeloid organ, or epigonal organ, was associated with testis (cranial, intermediate and caudal poles) of *Centroscyrnus coelolepis* and *C. squamosus*, two deep shark species with diametric type of testes.

The type of testes development exhibited by *R. lalandii* was described by Girard *et al.* (2000), in *C. squamosus*, by Theshima (1981) in *M. manazo* and *M. griseus*, and by Pratt (1979) in *P. glauca*. In these species cysts with spermatids and spermatozoa have been described in their immature stages, showing that spermatogenesis can occur in immature animals, an evidence that the testes mature before sharks are able reproduce. Unfortunately, it was not possible to observe this same characteristic in this study for the *P. glauca*, since no immature individuals were caught.

The range of Sertoli cell numbers (5-30) and cysts diameter (10.0-365.87) in this study are broader than those described in *M. schmitti* (Rojas, 2013). The number of Sertoli cells in this study tended to stabilize around twenty cells in the most advanced cyst cell

development (spermatozoa cysts), a number which is close to the one found for spermatozoa cysts in *M. schmitti* by Rojas (2013). This variation of Sertoli cell number with the spermatocyst development maybe assigned to the fact that Sertoli proliferation is higher when they are associated with cysts prior to the meiotic stage (spermatogonia and spermatocytes I cysts), since they probably have their mitotic activity reduced in spermatocysts with more advanced cell stage, as described in Nile tilapia and African catfish (Schulz *et al.*, 2005). The range of spermcysts diameter is similar to that reported for *T. marmorata* and *S. caniculus* (Stanley, 1966).

The increase of spermatocyte II cell diameter described for *R. lalandii* in this study was not usual to elasmobranch species, as compared, for example, with *Dasyatis sabina* (Maruska *et al.*, 1996), *M. schmitti* (Rojas, 2013) and *P. glauca* (this study). This aspect should be further investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CAPES for the PhD sandwich financial support, Facepe for funding the PhD scholarship over the years, Roger Meadows and the Bio-Imaging Facility staff at the University of Manchester for assistance in collecting histological images, and the University of Manchester for support.

REFERENCES

- Carrier, J. C. (1985) Nurse sharks of Big Pine Key: comparative success of three types of external tags. *Florida Scientist* **48**, 146-154.
- Carrier, J. C. & Luer, C. A. (1990) Growth rates in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Copeia* **1990**, 686-692.

- 307 Carrier, J. C., Pratt Jr., H. L. & Castro. J. I. (2004) Elasmobranch Reproduction.
 308 In *Biology of Sharks and Their Relatives* (Carrier, J. C., Musick, J. A. & Heithaus, M.
 309 R., eds), pp. 269-286.
- 310 Chatchavalvanich , K., Thogpan, A. & Nakai, M. (2004) Structure of the testis
 311 and genial duct of freshwater stingray , *Himantura signifier* (Elasmobranchii
 312 Myliobatiformes: Dasyatidae). *Ichthyological Research* **52**, 123-131.
- 313 Engel, K. B., & Callard, G. V. (2007) Endocrinology of Leydig cells in
 314 nonmammalian vertebrates. In *Contemporary Endocrinology: The Leydig Cell in*
 315 *Health and Disease*, Vol 3 (Payne, A. H. & Hardy, M. P., eds), pp. 207-224
- 316 Girard, M., Rivalan, P. & Sinquin, G. (2000) Testes and sperm morphology in
 317 two deep-water squaloid sharks, *Centroscyrnus ceololepis* and *Centrophorus*
 318 *squamosus*. *Journal of Fish Biology* **57**, 1575-1589.
- 319 Hamlett, W. C. (2007) The Testis and Spermatogenesis. In *Reproductive biology*
 320 *and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids, and chimaeras*, Vol. 3 (Engel, K. B.
 321 & Callard, G. V., eds), pp. 171- 200.
- 322 Hazin, F. H. V & Lessa, R. (2005) Synopsis of biological information available
 323 on blue shark, *Prionace glauca*, from the Southwestern Atlantic Ocean. *Collective*
 324 *Volume of Scientific Papers ICCAT* **58**, 1179-1187.
- 325 ICES (2013). Report of the workshop on Sexual Maturity Staging of
 326 Elasmobranchs (WKMSEL), 11-14 December 2012, Lisbon, Portugal. ICES CM
 327 2012/ACOM:59. 66 pp.
- 328 Kassab, M., Yanai, T., Ito, K., Sakai, H., Mesegi, T. & Yanagisawa, M. (2009)
 329 Morphology and Lectin histochemistry of the testes of brown-banded bamboo shark
 330 (*Chiloscyllium punctatum*). *Journal of Veterinary Anatomy* **3**, 49-66.

- 331 Loefer, J. K. & Sedberry, G. R. (2003) Life history of the Atlantic sharpnose
332 shark (*Rhizoprionodon terraenovae*) (Richardson, 18836) of the southeastern United
333 States. *Fishery Bulletin* **101**, 75-88.
- 334 Loir, M., Sourdain, P., Mendis-Handagama, S. M., & Jegou, B. (1995) Cell-cell
335 interaction in the testes of teleosts and elasmobranchs. *Microscopy Research and*
336 *Technique* **6**, 533-552.
- 337 Maruska, K. P., Cowie, E. G. & Tricas, T. C (1996) Periodic gonadal activity
338 and protracted mating in elasmobranch fishes. *Journal of Experimental Zoology* **276**,
339 219-232.
- 340 Matthews, L. H. (1950) Reproduction in the basking shark, *Cetorhinus maximus*,
341 (Gunner). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **234**,
342 247-316.
- 343 Parsons, G. R. & Grier, H. J. (1992) Seasonal changes in shark testicular
344 structure and spermatogenesis. *Journal of Experimental Zoology* **261**, 173 - 184.
- 345 Pratt, H. L. (1979) Reproduction in the Blue shark, *Prionace glauca*. *Fishery*
346 *Bulletin* **77**, 445-470.
- 347 Pratt, H. L. (1988) Elasmobranch gonad structure a description and survey.
348 *Copeia* **1988**, 719-729.
- 349 Rêgo, M. G., Fitzpatrick, J., Hazin, F.H.V., Araújo, M.L.G., Silveira, L.M.,
350 Oliveira, P. G. V. Evêncio-Neto, J. (2014) Characterization of testicular morphology and
351 spermatogenesis in the nurse sharks *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788).
352 Submetido a Zoomorphology.
- 353 Rojas, F. O. (2013) Testicular histology of *Mustelus schmitti* Springer, 1939
354 (Elasmobranchii, *Triakidae*). *BioScriba* **6**, 16-32.

- 355 Serra-Pereira, B., Moura, T., Griffiths, A. M., Gordo, L. S. & Figueiredo, I.
356 (2011) Molecular barcoding of skates (Chondrichthyes: Rajidae) from the southern
357 Northeast Atlantic. *Zoologica Scripta* **40**, 76–84.
- 358 Stanley, H. P. (1966) The structure and development of the seminiferous follicle
359 in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). *Zeitschrift für*
360 *Zellforschung* **75**, 453–468.
- 361 Teshima, K. (1981) Studies on the reproduction of Japanese dogfishes, *Mustelus*
362 *manazo* and *Mustelus griseus*. *Journal of the Shimonoseki University of Fisheries* **29**,
363 113-199.
- 364 Wourms, J. P. (1977) Reproduction and development in Chondrichthyan fishes.
365 *American Zoologist* **17**, 379-410.

Table 1. Range of total length (TL) and testes length (both in cm) of males from three species of male sharks sampled in this study at different maturity stages. Sample sizes (n) are indicated for each maturity stage.

Maturity stage	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>			<i>Prionace glauca</i>			<i>Mustelus canis</i>		
	n	TL (cm)	Testes Length	n	TL (cm)	Testes Length	n	TL (cm)	Testes Length
			(cm)			(cm)			(cm)
Immature	6	41-69	0.5-1	0	-	-	2	65-70	2-2.5
Developing	5	71.5-74.5	1.5-2	2	151-159	3-3.8	2	72-81	3-4
Capable to Reproduce	3	75.5-93	2.5-3	6	163-200	4-5.5	0	-	-

Table 2. Mean cysts diameters, number of Sertoli cells, and cells diameters per stage of spermatogenesis for capable to reproduce male *Rhizoprionodon lalandii* and *Prionace glauca*.

Species	Cells	Cysts Diameter (μm)	Sertoli Cell number	Cells Diameter (μm)
<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	Spermatogonia	15.74 (12.10 -19.53)	7.35 (5 – 10)	-
	Spermatocytes I	23.01 (15.95 – 28.01)	12.03 (11 – 18)	6.59 (5.23 - 7.74)
	Spermatocytes II	256.34 (186.88 -308.01)	11.85 (11 – 15)	7.40 (5.57 - 8.67)
	Spermatids	294.70 (269.44-359.62)	16.6 (16 – 25)	-
	Spermatozoa	282.36 (279.541 – 327.77)	21.25 (21 – 30)	-
<i>Prionace glauca</i>	Spermatogonia	27.74 (24.02 – 30.79)	9.06 (8 – 13)	-
	Spermatocytes I	52.90 (34.65- 69.54)	18.7 (13 – 27)	7.14 (5.23 - 9.67)
	Spermatocytes II	265.77 (245.1-322.40)	13.76 (7 – 26)	4.66 (4.16 - 5.91)
	Spermatids	304.58 (269.3- 324.32)	15.8 (10 – 29)	-
	Spermatozoa	305.75 (262.43 – 365.87)	20.64 (17 – 30)	-

Table 3. The cysts cell development stages in which statistics differences in the Sertoli cell numbers were detected by Dunn's Multiple Comparisons Test, within *Rhizoprionodon lalandii* and *Prionace glauca*.

Species	Cells per stages	Sertoli Cell number
<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	Spermatogonia with spermatid	p<0.001
	Spermatogonia with Spermatozoa	p<0.001
	Spermatocytes I with spermatocytes II	p=0.015
	Spermatocytes I with Spermatids	p<0.001
	Spermatocytes I with Spermatozoa	p<0.001
<i>Prionace glauca</i>	Spermatogonia with spermatocytes I	p=0.0106
	Spermatogonia with Spermatozoa	p<0.001
	Spermatocyte II with spermatozoa	p=0.0012

(p< 0.0001, were considered extremely significant)

Table 4. The cysts cell development stages in which statistics differences in the cysts diameter were detected by Dunn's Multiple Comparisons Test, within *Rhizoprionodon lalandii* and *Prionace glauca*.

Species	Cells per stages	Cysts diameter
<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	Spermatogonia with spermatocytes II	p<0.001
	spermatogonia with spermatid	p<0.001
	Spermatogonia with spermatozoa	p<0.001
	Spermatocytes I with spermatocytes II	p=0.045
	Spermatocytes I with spermatid	p<0.001
	Spermatocytes I with spermatozoa	p<0.001
<i>Prionace glauca</i>	Spermatogonia with spermatid	p<0.001
	Spermatogonia with Spermatozoa	p<0.001
	Spermatocyte I with spermatid	p=0,003

(p< 0.0001, were considered extremely significant)

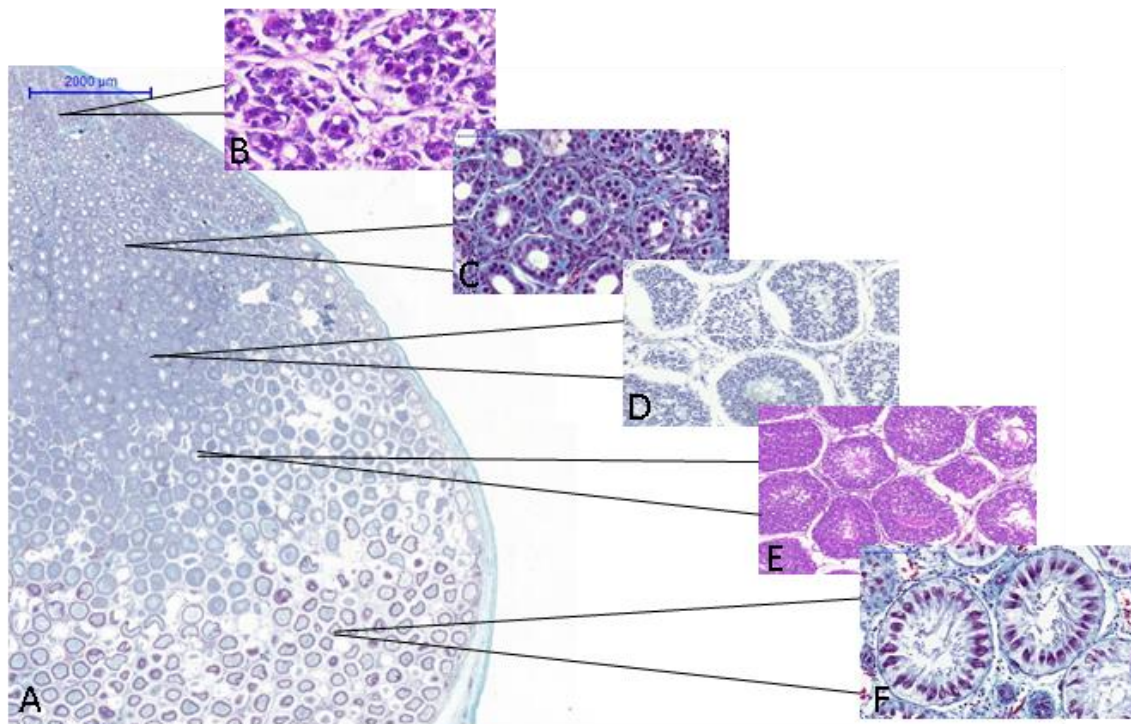


Fig. 1. Photomicrography of the blue shark: A – Macroscopic general testes, staining: Gomori Trichrome. B – spermatogonia, staining: HE. C – spermatocytes primary, staining: Gomori Trichrome. D - spermatocytes secondary, staining: Gomori Trichrome. E- spermatids, staining: HE. F – sperm, staining: Gomori Trichrome.

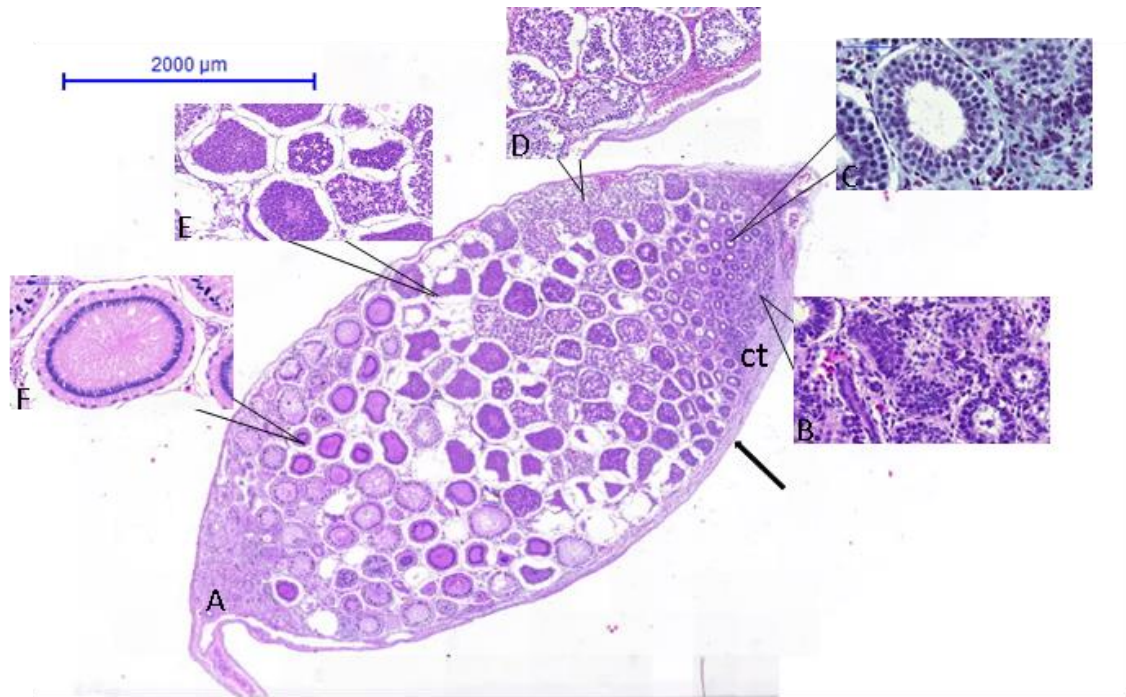


Fig. 2. Photomicrography of the sharpnose shark: A – Macroscopic general testes. B – spermatogonia. C – spermatocytes primary. D- spermatocytes secondary. E- spermatids. F – sperm. Ct- conective tissue and arrow albuginea tunica staining: HE.

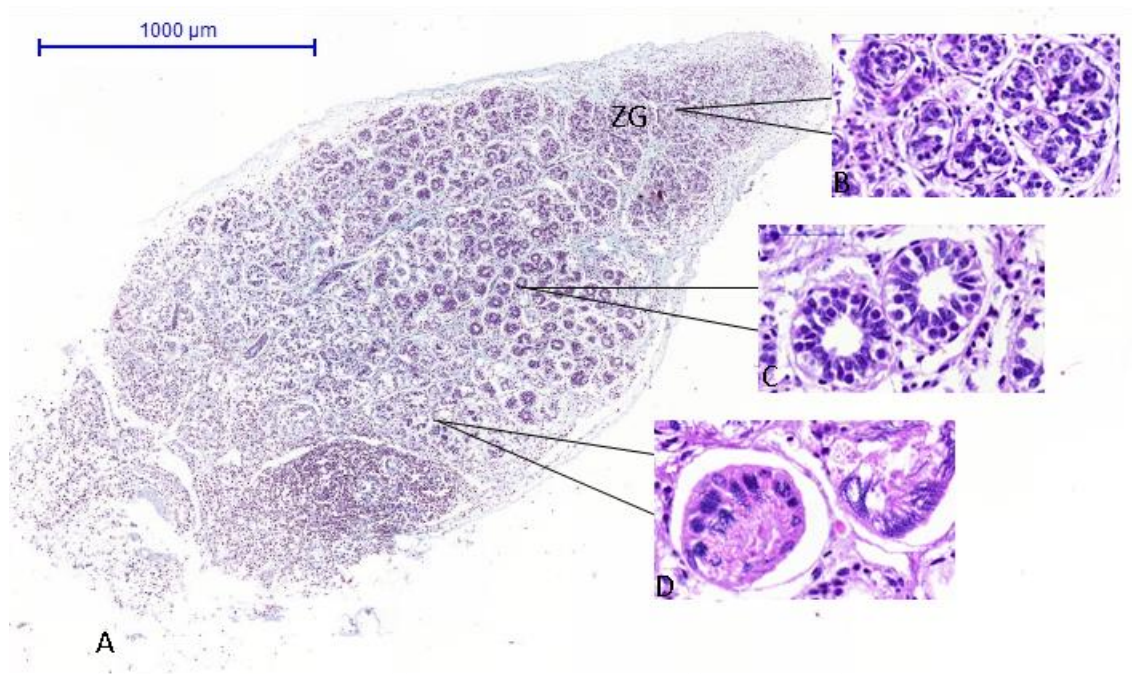


Fig. 3. Photomicrography of the dusky smooth-hound: A – Macroscopic general testes, staining: Gomori Trichrome. B – spermatogonia, staining: HE. C – spermatocytes primary, staining: HE. D- spermatids beginning to divide to form sperm clumps, staining: HE.

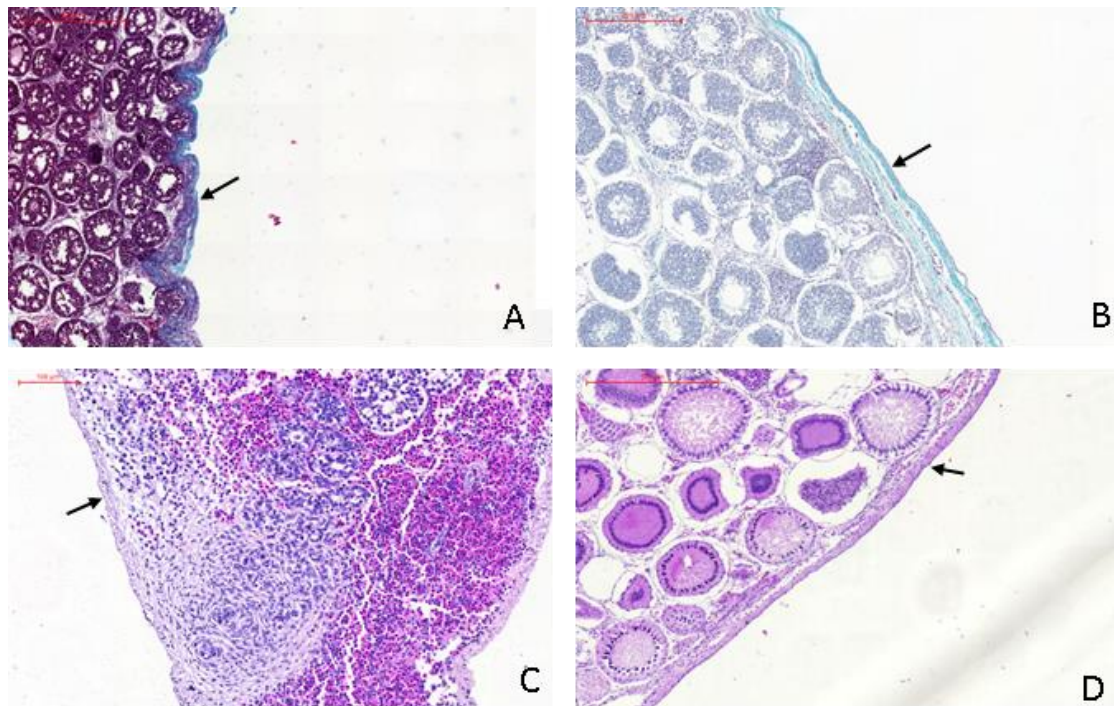


Fig. 4. Photomicrography of the testis wall: A – *Prionace glauca* developing stage arrow indicate the thin wall, staining: Gomori Trichrome. B – *Prionace glauca* capable to reproduce stage, arrow indicate the thick wall, staining: Gomori Trichrome. C – *Rhizoprionodon lalandii* developing stage, arrow indicate the thin wall, staining: HE. D- *Rhizoprionodon lalandii* capable to reproduce stage, arrow indicate the thick wall, staining: HE.