

**GISELE CRISTIANE DE MELO DIAS**

**CARACTERIZAÇÃO, ISOLAMENTO E CULTURA DE  
ESPERMATOGÔNIAS PRIMÁRIAS DE CURIMBATÁ,  
*Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847).**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

**Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).**

**São Paulo**

**2015**

## RESUMO

DIAS, G. C. M. **Caracterização, isolamento e cultura de espermatogônias primárias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847)**. 2015. 144 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

*Prochilodus lineatus* (curimatá) é uma espécie sulamericana de teleósteo que oferece grandes vantagens à piscicultura, pela sua prolificidade e pela facilidade com que se podem fecundar artificialmente os seus ovócitos. O objetivo principal do presente trabalho foi obter informações básicas sobre os testículos e suas células na evolução da espermatogênese, especialmente as espermatogônias primárias; avaliar a proporção volumétrica dos testículos ocupada por estruturas do compartimento tubular e intertubular, das regiões anterior-A, média-M e posterior-P dos testículos; e determinar o número médio das espermatogônias primárias por testículos, além de determinar a fase e a subfase reprodutiva dos animais utilizados nas análises estereológica e morfométrica, para obter informações para isolar e cultivar as espermatogônias primárias *in vitro*. Machos adultos de *P. lineatus* tiveram suas gônadas coletadas e fixadas. Em seguida, os fragmentos das regiões A, M e P foram processados de acordo com as rotinas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Análises histológicas, estereológicas e morfométricas foram feitas. Para a cultura de células, os testículos foram digeridos enzimaticamente, a suspensão testicular foi separada por gradiente descontínuo com Percoll seguido pelo plaqueamento diferencial por adesão. As células foram cultivadas em meio de cultura propício para proliferação celular e para diferenciação com a adição de BrdU. As células cultivadas foram analisadas pelo método de imunofluorescência com anticorpos anti-Vasa, anti-GFR $\alpha$ 1, anti-OCT4 e anti-BrdU. Foi realizado o método de enriquecimento das espermatogônias por citometria de fluxo. Os dados estereológicos sugerem que os componentes dos compartimentos tubular e intertubular dos testículos de *P. lineatus* apresentam distribuição uniforme nas regiões A, M e P. Os resultados deste estudo contribuem para melhor compreensão da estrutura e morfologia dos testículos e, principalmente, a caracterização das espermatogônias primárias em *P. lineatus*. Ao que se saiba, não há relato na literatura sobre a investigação estereológica da proporção volumétrica dos componentes testiculares (tubular e intertubular) em diferentes regiões dos testículos, e avaliação estereológica e morfométricas do número de espermatogônias primárias por testículos em teleósteos. Os testículos coletados em maio apresentam as três regiões com distribuição semelhante dos tipos de células, e o diâmetro nuclear das células germinativas diminui significativamente durante a espermatogênese. As espermatogônias cultivadas por 15 dias com meio de cultura propício para proliferação celular resultaram em grandes aglomerados celulares que foram caracterizados com o anti-Vasa, anti-GFR $\alpha$ 1 e anti-OCT4. Não houve diferença aparente entre as amostras que receberam o extrato embrionário de *P. lineatus* (EEPI) e as amostras que não receberam o EEPI quando se adicionou o meio de cultura indicado para diferenciação celular. Foi observado nas culturas processo de proliferação lento das espermatogônias primárias comparado com a cultura que teve o meio indicado para proliferação celular. Os estudos morfológicos por meio de análises morfométricas, histoquímicas e imuno-histoquímicas, aliados a condições específicas de cultura celular, poderão esclarecer alguns aspectos da regulação espermatogonial e aprimorar o entendimento da regulação do processo de manutenção *in vitro* das células germinativas, o que contribuirá para o aprimoramento de técnicas de reprodução *in vivo* e *in vitro*.

**Palavras-chave:** Espermatogônias primárias. Morfometria. Estereologia. Cultura de células. Testículos. Peixes teleósteos.

## ABSTRACT

DIAS, G. C. M. **Characterization, isolation and culture of primary spermatogonias of curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847)**. 2015. 144 p. Ph. D. Thesis (Cell Biology and Tissue) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

*Prochilodus lineatus* (curimatá) is a South American species of teleost that offers great advantages to fish farming, for its fantastic prolificacy and the ease with which one can artificially fertilize their oocytes. The main objective of this study was to obtain basic information about the testes and its cells in the evolution of spermatogenesis, especially primary spermatogonia; to evaluate the volume proportion of the testes occupied by the tubular and intertubular compartment structures of the anterior-A, middle-M, and posterior-P regions of the testes; to determine the mean number of primary spermatogonia per testes; and to determine the reproductive subphase and phase of the animals used for stereological and morphometric analyzes to have information to isolate and culture *in vitro* primary spermatogonia. Adult males of *P. lineatus* had their gonads extracted and fixed. Then, fragments of the A, M, and P regions were used according routines of light microscopy and transmission electron microscopy. Histological, stereological, and morphometric analyses were made. The testes were enzymatically digested; testicular suspension was separated by discontinuous gradient with Percoll followed by adhesion differential plating. The cells were cultured in culture medium conducive to cell proliferation and differentiation with addition of BrdU. The cultured cells were analyzed by immunofluorescence with anti-Vasa, anti-GFR $\alpha$ 1, anti-OCT4 and anti-BrdU. The enrichment of the spermatogonia was carried by flow cytometry. The stereological data suggest that components of the tubular and intertubular compartments of the *P. lineatus* testes present uniform distribution in the A, M, and P regions. The results from this study contribute to a better understanding of the morphology and structure of the testes and, mainly, the characterization of the type A spermatogonia in *P. lineatus*. To our knowledge, there is no report in the literature dealing specifically the stereological investigation of the volumetric proportion of the testicular components (tubular and intertubular) in different regions of the testes, and stereological and morphometric evaluation of the number of type A spermatogonia per testes in teleosts. In addition, that testes collected in May present three regions with similar distribution of cell types, and nuclear diameter of germ cells decreases significantly during spermatogenesis. The spermatogonia cultured for 15 days with culture medium conducive to cell proliferation resulted in large cell agglomerates which were characterized with the antibodies anti-Vasa, anti-GFR $\alpha$ 1 and anti-OCT4. There was no apparent difference in the samples that received *P. lineatus* embryo extract (EEPI), and the samples that did not receive the EEPI, when culture medium conducive to cell differentiation was added. Slow proliferation process of primary spermatogonia was observed in cultures compared to cell culture medium conducive to cell proliferation. The morphological studies by morphometric, histochemical and immunohistochemical analysis, combined with specific conditions of cell culture, may explain some aspects of spermatogonial regulation, and may enhance the understanding of the regulation of the *in vitro* maintenance of germ cells, which will contribute to the improvement of reproductive *in vivo* and *in vitro* techniques.

**Keywords:** Primary spermatogonia. Morphometry. Stereology. Cell culture. Testes. Teleost fish.

## 1 INTRODUÇÃO

A proposta em questão teve como objetivo principal identificar e caracterizar as espermatogônias de *Prochilodus lineatus*, e padronizar métodos que permitam isolar as espermatogônias primárias de peixes doadores para, posteriormente, manter estas células em cultivo, com a possibilidade futura de se produzir células mais diferenciadas *in vitro*, e utilizar estas células em programas de reprodução artificial. Esta abordagem, além do mérito científico, pode ser vinculada à preservação da diversidade biológica, assim como pode ser de grande interesse sócio-econômico, considerando especialmente as estações de piscicultura que reproduzem artificialmente espécie de importância comercial. Essa técnica, quando implementada nestas situações, pode ser extremamente vantajosa, pois todos os animais doadores em potencial, incluindo juvenis e adultos, possuem espermatogônias primárias permanentemente em seus testículos, e, desta forma, a obtenção das mesmas pode ocorrer em qualquer época do ano.

A potencialização da produção de espermatogônias primárias, de células germinativas mais diferenciadas e da reprodução de espécies ameaçadas de extinção poderia substituir o transplante de células germinativas, permitindo o mesmo resultado *in vitro* com várias vantagens, a começar pela drástica redução no uso de animais a serem manipulados. Um contínuo suprimento de espermatogônias requer a criação de um grande número de peixes doadores em cativeiro. Isto poderia ser superado pelo desenvolvimento de um sistema de cultura *in vitro* que permite que a espermatogônia se multiplique e seja mantida por longos períodos.

O maior sucesso da técnica de cultivo de células germinativas requer a obtenção de populações celulares ricas em espermatogônias, pois, dentre as diversas células do processo espermatogênico que podem ser coletadas nos túbulos seminíferos, e eventualmente se diferenciar, apenas as espermatogônias primárias têm a capacidade de se auto-renovar e de formar continuamente células germinativas mais maduras (BRINSTER; AVARBOCK, 1994).

A padronização desta metodologia foi realizada utilizando-se o curimatá, *Prochilodus lineatus*, como espécie doadora, por esta ser uma espécie nativa da América do Sul, rústica, de fácil obtenção e manejo, e com a possibilidade de ser obtida em número suficiente para a realização da pesquisa. Além disso, esta espécie é de piracema, e, desta forma, a desova não ocorre sem indução em animais de cultivo, o que corrobora com a escolha da espécie pela possibilidade da mesma ser beneficiada no futuro com os resultados da pesquisa.

Estudos atuais relacionados com a proposta deste trabalho, foram realizados, até onde se saiba, com duas espécies, o peixe medaka (*Oryzias latipes*) (HONG et al., 2004), encontrado no hemisfério Norte e nativo do Sudeste Asiático, e a carpa indiana rohu (*Labeo rohita*) (PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011). Estas espécies não são peixes migradores. Em contrapartida, a metade do número de espécies do hemisfério Sul é de piracema. No presente trabalho, a exposição resumida de fatores que levam a um custo alto na produção de espécies nativas de água doce mostra a importância de seu papel na economia do hemisfério Sul.

Avaliações histológicas, morfométricas e estereológicas são ferramentas adequadas para se ter um melhor entendimento da estrutura testicular, do processo espermatogênico e da função dos testículos em peixes (ALVARENGA; FRANÇA, 2009; LEAL et al., 2009; SCHULZ et al., 2005). Estas ferramentas permitem estimar o diâmetro nuclear de espermatogônias primárias até espermatozoides, fornecendo informação sobre a evolução nuclear durante o processo espermatogênico; determinar a proporção volumétrica dos componentes testiculares entre diferentes regiões dos testículos, fornecendo informação no padrão de distribuição destes componentes ao longo do comprimento deste órgão; e determinar o número de espermatogônias primárias por testículo.

Desta forma, os dados obtidos pelas análises morfométrica e estereológica servirão para aprimorar o nosso conhecimento sobre a biologia dos testículos e das espermatogônias primárias de *P. lineatus*. Além disso, há uma escassez de estudos morfológicos e morfométricos disponíveis na literatura quanto à estrutura testicular desta espécie e de outros Characiformes. Portanto, os resultados desta análise contribuirão para um melhor entendimento morfofuncional dos testículos desta ordem, e poderão servir de parâmetro para outros estudos correlacionados.

Partindo do exposto, algumas importantes ferramentas emergem como incremento para a padronização de técnicas que permitam a futura obtenção de espermatozoides *in vitro* de peixes para serem utilizados em espécies ameaçadas de extinção e/ou de importância comercial: a identificação, o isolamento e o cultivo apropriados das espermatogônias primárias e a análise do seu processo de diferenciação. Além disso, estas ferramentas são essenciais para uma variedade de estudos, principalmente, quando se visa o estabelecimento de sistemas de cultura de espermatogônias primárias (tronco) que poderia oferecer um melhor entendimento do comportamento da proliferação, autorrenovação e diferenciação dessas células.

## 7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, concluiu-se que:

- ✓ Os testículos de *P. lineatus* seguiram os padrões da maioria dos teleósteos quanto à distribuição, morfologia e composição dos compartimentos tubular e intertubular;
- ✓ Houve diminuição celular e nuclear das células germinativas, de espermatogônia primária até espermatozoide, durante o processo espermatogênico em *P. lineatus*, sendo que a diminuição nuclear, avaliada estatisticamente, mostrou-se significativa;
- ✓ A fase do ciclo reprodutivo de *P. lineatus* utilizada nas análises morfométrica e estereológica foi determinada como "Apto para Reprodução" e, de acordo com a estrutura do epitélio germinativo, como subfase de Epitélio Germinativo Médio, em todos os machos avaliados;
- ✓ Não houve diferença significativa na proporção volumétrica do compartimento tubular em *P. lineatus* entre as regiões anterior, média e posterior dos testículos, assim como, na proporção volumétrica dos componentes (espermatogônias primárias e secundárias, espermatócitos primários e secundários, espermátides, espermatozoides, células de Sertoli, lúmen tubular e túnica própria);
- ✓ Não houve diferença significativa na proporção volumétrica do compartimento intertubular e dos componentes que fazem parte dele (células de Leydig, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo) entre as regiões anterior, média e posterior dos testículos;
- ✓ No processo de isolamento das espermatogônias primárias, o uso do gradiente de Percoll é recomendado, pois reduziu a quantidade inicial de células somáticas e células germinativas mais avançadas, apesar de ainda restar uma população bastante heterogênea no final do processo;
- ✓ Também no plaqueamento diferencial por adesão, realizado após a pré-separação com Percoll, obtivemos aumento no número de espermatogônias primárias, na taxa de sobrevivência e na proliferação destas células, reforçando a recomendação da sua utilização;
- ✓ Foi possível separar parcialmente diferentes populações celulares, em especial, as espermatogônias primárias, a partir do tamanho e da granularidade, sem algum marcador, pelo método de isolamento e enriquecimento das espermatogônias primárias realizado pelo *Cell sorting*, por citometria de fluxo das células germinativas, oriundas do processo de separação com e sem Percoll;

- ✓ Foi possível obter intensa proliferação das espermatogônias em grandes aglomerados celulares no final do cultivo, frequentemente aderidos fracamente às células de Sertoli;
- ✓ As amostras contendo meio de cultura sugestivo para proliferação celular e que não tiveram o meio trocado, em 15 dias, de cultivo apresentaram maior número de células e proliferação celular mais intensa comparado com as amostras que tiveram a metade do meio trocado a cada 3 dias;
- ✓ Aparentemente, não houve diferença, na cultura com meio sugestivo para diferenciação celular, entre a amostra que recebeu o extrato embrionário de *P. lineatus*, e a amostra que não recebeu o extrato;
- ✓ Foi possível caracterizar as células cultivadas como espermatogônias primárias pelo método de imunofluorescência, com o uso do anti-Vasa, anti-GFR $\alpha$ 1 e anti-OCT4.

## REFERÊNCIAS\*

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; JÚLIO, H. J. Migratory fish from the upper Paraná River Basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. World Fisheries Trust**. Victoria: The World Bank and the International Development Research Centre, 2003. p. 19–99.
- AGUILLEIRO, B.; GARCIA-HERNÁNDEZ, M. P.; GARCÍA-AYALA, A. Teleost adenohipofise: morfofuncional e desenvolvimento aspectos. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPPOR, B. G. **Fish Endocrinology**. Enfield: Science Publishers, 2006. v. 1, p. 287–323.
- ALEXANDRINO, A. C.; PHAN, M. T.; PINHEIRO, E. F. G. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, durante o ciclo reprodutivo. **Boletim de Zoologia**, v.9, p. 159–175, 1985.
- ALVARENGA, É. R.; FRANÇA, L. R. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 537–544, 2009.
- ANDRADE, R. F.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). **Tissue & Cell**, v. 33, p. 524–532, 2001.
- BATLOUNI, S.R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 116–132, 2006.
- BAUMBERGER, R. E.; BROWN-PETERSON, N. J.; REED, J. K.; GILMORE, R. G. Spawning aggregation of beardfish, *Polymixia lowei*, in a deep-water sinkhole off the Florida Keys. **Copeia**, v. 1. p. 41–46, 2010.
- BELLVÉ, A. R.; CAVICCHIA, J. C.; MILLETTE, C. F.; O'BRIEN, D. A.; BHATNAGAR, Y. M.; DYM, M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. **Journal of Cell Biology**, v. 74, n. 1, p. 68–85, 1977.
- BILLARD R. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. **Annual Biology animal Biochemistry and Biophysical**, v. 9, n. 3, p. 307–313.
- BILLARD R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species (1). **Reproduction Nutrition Development**, v. 26, p. 877–920, 1986.
- BLÁZQUEZ, M.; BOSMA, P. T.; FRASER, E. J.; VAN LOOK, K. J. W.; TRUDEAU, V. L. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. **Comparative Biochemistry and Physiology (C)**, v. 119, p. 345–364, 1998.

---

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.



BRAAT, A. K.; SPEKSNIJDER, J. E.; ZIVKOVIC, D. Germ line development in fishes. **International Journal of Developmental Biology**, v. 43, p. 745–760, 1999.

BRINSTER, R. L.; AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 11303–11307, 1994.

BROWN-PETERSON, N. J.; HEINS, D. C. Interspawning interval of wild female three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* in Alaska. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 2299–2312, 2009.

BROWN-PETERSON, N.J.; WYANSKI, D.M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B.J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, v. 3, p. 52–70, 2011.

BRULÉ, T.; COLÁS-MARRUFO, T.; PÉREZ-DÍAZ, E.; SÁMANO-ZAPATA, J. C. Red snapper reproductive biology in the Southern Gulf of Mexico. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 139, p. 957–968, 2010.

CAIRES, K.; BROADY, J.; MCLEAN, D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. **Journal of Endocrinology**, v. 205, p.133–145, 2010.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 361–366, 2007.

CAUTY, C.; LOIR, M. The interstitial cells of the trout testis (*Oncorhynchus mykiss*): ultrastructural characterization and changes throughout the reproductive cycle. **Tissue & Cell**, v. 27, p. 383–395, 1995.

CINQUETTI R.; DRAMIS, L. Histological, histochemical, enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* between annual breeding seasons. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 1402–1428, 2003.

COOPER GM. **A célula: uma abordagem molecular**. Porto Alegre: Artmed Editora; 2002. 712 p.

COSTA, G. M. J.; CHIARINI-GARCIA, H.; MORATO, R. G.; ALVARENGA, R. L. L. S.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 70, p. 1136–1146, 2008.

COSTA, G. M. J.; LEAL, M. C.; FERREIRA, A. C. S.; GUIMARÃES, D. A.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in 2 large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). **Journal of Andrology**, v. 31, p. 489–499, 2010.

COSTA, G. M. J.; AVELAR, G. F.; REZENDE-NETO, J. V.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; LACERDA, S. M. S. N.; ANDRADE, B. S. C.; THOMÉ, R. G.; HOFMANN, M. C.; FRANÇA, L. R. Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. **PLOS ONE**, v. 7, Issue 8, p. 1–13, 2012.

EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. **The physiology of fishes**. New York: CRC Press, 2006. 601 p.

DE ROOIJ, D.G.; OKABE, M.; NISHIMUNE, Y. Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, SL17H/SL17H, and cryptorchid mice. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 842–847, 1999.

DOMINGOS, F. F. T.; THOMÉ, R. G.; ARANTES, F. P.; CASTRO, A. C. S.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in an area of influence of a tributary, downstream from a hydroelectric power dam, Brazil. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 1709–1719, 2012.

FANTA, E. Influence of the background color on the behaviour of the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 4, p. 1237–1251, 1995.

FAO – Fisheries Department. **State of world aquaculture**. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations. 145p.<http://www.fao.org>. Acesso em: 31 out. 2006.

FISHELSON L. Comparison of testes structure, spermatogenesis, and spermatocytogenesis in young, aging, and hybrid ciclid fish (Ciclidae, Teleostei). **Journal of Morphology**, v. 256, p. 285–300, 2003.

FISHELSON, L.; DELAREA, Y.; GON, O. Testis structure, spermatogenesis, spermatocytogenesis, and sperm structure in cardinal fish (Apogonidae, Perciformes). **Anatomy and Embryology**, v. 211, p. 31–46, 2006.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 351–360, 2007.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**: subordem Characoidei, bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba: Franciscana, 1975. v. 1–2.

GONÇALVES, A. C. S.; NASCIMENTO, A. F.; COSTA, A. C.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Animal Reproduction**, v.10, n.1, p. 62–70, 2013.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoology**, v.21, p. 345–357.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: **The Sertoli cell**. RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. Clearwater: Cache River Press, 1993. p. 703–739.

GRIER, H. J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. **Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, v. 53, p. 537–552, 2002.

HAYASHI, M.; SATO, M.; NAGASAKA, Y.; SADAIE, S.; KOBAYASHI, S.; YOSHIZAKI, G. Enrichment of Spermatogonial Stem Cells Using Side Population in Teleost. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 23, p.1–8, 2014.

HE, Z.; KOKKINAKI, M.; JIANG, J.; DOBRINSKI, I.; DYM, M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 363–372, 2010.

HONG, Y.; SCHARTL, M. Isolation and differentiation of medaka embryonic stem cells. In: Turksen, K. (Ed.), **Embryonic Stem Cell Protocols**. Methods in Molecular Biology. New Jersey: Humana Press Inc, 1996. p. 5–16.

HONG, Y.; LIU, T.; ZHAO, H.; XU, H.; WANG, W.; LIU, R.; CHEN, T.; DENG, J.; GUI, J. Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 8011–8016, 2004.

KHAIRA, H.; MCLEAN, D.; OHL, D. A.; SMITH, G. D. Spermatogonial Stem Cell Isolation, Andrology Lab Corner\* Storage, and Transplantation. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, p. 442–450, 2005.

HULEIHEL, M.; ABUELHIJA, M.; LUNENFELD, E. *In vitro* culture of testicular germ cells: Regulatory factors and limitations. **Growth Factors**, v. 25, n. 4, p. 236–252, 2007.

KANATSU-SHINOHARA, M.; INOUE, K.; LEE, J.; YOSHIMOTO, M.; Ogonuki, N.; MIKI, H.; BABA, S.; KATO, T.; KAZUKI, Y.; TOYOKUNI, S.; TOYOSHIMA, M.; Niwa, O.; Oshimura, M.; HEIKE, T.; NAKAHATA, T.; ISHINO, F.; OGURA, A.; SHINOHARA, T. Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis. **Cell**, v. 119, p. 1001–1012, 2004.

KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Mudanças morfológicas dos testículos de curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner) (Teleostei, Prochilodontidae), submetido à indução hormonal. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, p. 109–115, 1998.

KAWASAKI, T.; SAITO, K.; SAKAI, C.; SHINYA, M.; SAKAI, N. Production of zebrafish offspring from cultured spermatogonial stem cells. **Genes to Cells**, v. 17, p. 316–325, 2012.

KISE, K.; YOSHIKAWA, H.; SATO, M.; TASHIRO, M.; YAZAWA, R.; NAGASAKA, Y.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Flow-Cytometric Isolation and Enrichment of Teleost Type A Spermatogonia Based on Light-Scattering Properties. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 4, p. 1–12, 2012.

KOULISH, S.; KRAMER, C.R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, v.254, p. 292–311, 2002.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. **PNAS**, v. 100 n. 11, p. 6487–6492, 2003.

LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; SILVA, S. B. G.; HOMEM, C. S. P.; FRANÇA, L. R. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. **Animal Reproduction**, v.3, n.2, p. 146–159, 2006.

LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; ASSIS, L. H.; RESENDE, F. M.; CAMPOS-SILVA, S. M.; CAMPOS-SILVA, R.; SEGATELLI, T. M.; FRANÇA, L. R. Germ cell transplantation in tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Cybium**, v. 32, p. 115–118, 2008.

LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; COSTA, G. M. J.; SEGATELLI, T. M.; QUIRINO, B. R.; QUEIROZ, B. M.; KALAPOTHAKIS, E.; FRANÇA, L. R. A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) **Model**, v. 5, Issue 5, p. 1–9, 2010.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y.; MORITA, T.; YOSHIZAKI, G.; FRANÇA, L. R. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n.1, p. 3–11, 2012.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; PEIXOTO, M. T. D.; RESENDE, R. R.; FRANÇA, L. R. Phenotypic characterization and *in vitro* propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 1, n. 192, p. 95–106, 2013.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; FRANÇA, L. R. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. **General and Comparative Endocrinology**, DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.06.018, 2014.

LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NÓBREGA, R.H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Histological and stereological evaluation of *Zebrafish* (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 177–187, 2009.

LO NOSTRO, F. L.; GRIER, H.; MEIJIDE, F. J.; GUERRERO, G. A. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. **Tissue & Cell**, v. 35, p. 121–132, 2003.

LO NOSTRO, F. L.; ANTONELI, F. N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GUERRERO, G. A. Testicular interstitial cells, and steroidogenic detection in the protogynous fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). **Tissue & Cell**, v. 36, p. 221–231, 2004 .

LUCAS, M. C.; BARAS, E. 2001. Migration of freshwater fishes. Blackwell Science. 420p. In: MELO, F. C. S. A.; GODINHO, H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 380–385, 2006.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1. ed. Brasília: MMA; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. 1420 p.

MAGALHÃES, A. L. B.; ANDRADE, R. F.; GOMES, B. V. C.; PERINI, V. R.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Ultrastructure of the semicystic spermatogenesis in the South American freshwater characid *Hemigrammus marginatus* (Teleostei, Characiformes). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, p. 1041–1046, 2011.

MATTA, S. L. P.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the Tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 970–978, 2002.

MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 5774–5778, 1991.

MIURA T. Spermatogenic cycle in fish. In: Knobil & Neill JD (eds.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999. v. 4, p. 571–578.

MORIMOTO, H.; KANATSU-SHINOHARA, M.; TAKASHIMA, S.; CHUMA, S.; NAKATSUJI, N.; TAKEHASHI, M.; SHINOHARA, T. Phenotypic Plasticity of Mouse Spermatogonial Stem Cells. **PLoS ONE**. v. 4, Issue 11, 1-9, 2009.

MOYLE, P. B.; CECH, J. J. **Fishes. An introduction to ichthyology**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2003. 590p.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983, p. 223–264.

NAKAGHI, L. S. O.; MITSUIKI, D.; SANTOS, H. S. L.; PACHECO, M. R.; GANECO, L. N. Morphometry and morphology of nucleus of the sertoli and interstitial cells of the tambaqui *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1881) (Pisces: Characidae) during the reproductive cycle. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 97–104, 2003.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4. ed. New York: Wiley – Interscience, 2006. 624p.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p.197–206, 2009.

NÓBREGA, R. H.; CAAJ, C. D.; KANT, H. V.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1–16, 2010.

PANDA, R. P.; BARMAN, H. K.; MOHAPATRA C. Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from *Labeo rohita* testis for *in vitro* propagation. **Theriogenology**, v. 15, p. 241–251, 2011.

PARENTI, L. R.; GRIER, H. J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and Comparative Biology**, v. 44, p. 333–348, 2004.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, v. 6, p. 459–497, 1995.

PURCHTLER, H.; WALDROP, F. S.; MELOAN, S. N.; TERRY, M. S.; CONNER, H. M. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. **Histochemie**, v. 21, p. 97–116, 1970.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; CARVALHO, E. D. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. **Tissue and Cell**, v. 31, p. 561–567, 1999.

QUINTERO-HUNTER, I; GRIER, H.; MUSCATO, M. Enhancement of Histological Detail Using Metanil Yellow as Counterstain in Periodic Acid Schiff's Hematoxylin Staining of Glycol Methacrylate Tissue Sections. **Biotechnic & Histochemistry**, v.66, p. 169–172, 1999.

RAMOS, R. O.; PERET, A. C.; RAMOS, S. M.; MELO, J. S. C. Parâmetros reprodutivos do curimatá no rio Mogi-Guaçu. **Revista Ceres**, v. 57, p. 520–525, 2010.

RESENDE, E. K.; CATELLA, A. C.; NASCIMENTO, F. L.; PALMEIRA, S. S.; PEREIRA, R. A. C.; LIMA, M. S.; ALMEIDA, V. L. L. **Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP; 1996. Boletim de Pesquisa.

ROCHA, M. J.; ROCHA, E. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes – An overview. p. 570–624. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPPOR, B. G. **Fish Endocrinology**. Enfield: Science Publishers, v. 2, 2006. 871p.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; TALMELLI, E. F. A.; BRAGA, M. S. Mudanças morfológicas dos testículos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. **Revista UNIMAR**, v. 15, p. 1–17, 1993.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; AYROZA, L. M. S.; BORELLA, M. I.; FENERICH-VERANI, N. Reproductive cycle of male matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 17, p. 101–105, 2000.

RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue & Cell**, v. 27, p. 129–147, 1995.

SÀBAT, M.; LO NOSTRO, F.; CASADEVALL, M.; MUÑOZ, M. A light and electron microscopic study on the organization of the testis and the semicyclic spermatogenesis of the Genus *Scorpaena* (Teleostei, Scorpaenidae). **Journal of Morphology**, v. 270, p. 662–672, 2009.

SAKAI, N. Transmeiotic differentiation of zebrafish germ cells into functional sperm in culture. **Development**, v. 129, p. 3359–3365, 2002.

SANTOS, E. **Peixes de água doce**. Rio de Janeiro: F. Briguiet & CIA, 1962. 272 p.

SASAKI, T.; WATANABE, A.; TAKAYAMA-WATANABE, E.; SUZUKI, M.; ABE, H.; ONITAKE, K. Ordered progress of spermiogenesis to the fertilizable sperm of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in cell culture. **Development Growth Differentiation**, v. 47, n. 2, p. 87–97, 2005.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 43–56, 2002.

SCHULZ, R. W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L.R.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P. Sertoli cell proliferation in the adult testis—evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 891–898, 2005.

SCHULZ, W. R.; DE FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LeGac, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 390–411, 2010.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **American Zoologist**, v. 26, p. 173–192, 1986.

SERRA-PEREIRA, B.; FIGUEIREDO, I.; GORDO, L. S. Maturation of the gonads and reproductive tracts of the thornback ray *Raja clavata*, with comments on the development of a standardized reproductive terminology for oviparous elasmobranchs. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, v. 3, p. 160–175, 2011 .

SHIKINA, S.; IHARA, S.; YOSHIZAKI, G. Culture Conditions for Maintaining the Survival and Mitotic Activity of Rainbow Trout Transplantable Type A Spermatogonia. **Molecular Reproduction And Development**, v. 75, p. 529–537, 2008.

SHIKINA, S.; YOSHIZAKI, G. Improved *In Vitro* Culture Conditions to Enhance the Survival, Mitotic Activity, and Transplantability of Rainbow Trout Type A Spermatogonia. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 268–276, 2010.

SHIKINA, S.; NAGASAWA, K.; HAYASHI, M.; FURUYA, M.; IWASAKI, Y.; YOSHIZAKI, G. Short-Term *In Vitro* Culturing Improves Transplantability of Type A Spermatogonia in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Molecular Reproduction & Development**, v. 80, p. 763–773, 2013.

TAKEI, Y.; LORETZ, C. A. Endocrinology. In: EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. **The Physiology of Fish**. 3 ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p. 271–318.

TOLKUNOVAA, E. N.; MALASHICHEVAA, A. B.; CHIKHIRZHINAA, E. V.; KOSTYLEVAA, E. I.; ZENG, W.; LUOC, J.; DOBRINSKIC, I.; HIERHOLZERB, A.; KEMLERB, R.; TOMILIN, A. N. E-Cadherin as a Novel Surface Marker of Spermatogonial Stem Cells. **Cell and Tissue Biology**, v. 3, n. 2, p. 103–109, 2009.

TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 6, p. 287–318, 1996.

VICENTINI, C. A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; BENETTI, E. J.; ORSI, A. M. Testicular ultrastructure and morphology of the seminal pathway in *Prochilodus scrofa*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 33, p. 357–362, 2001.

VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G.B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 187–190, 2003.

VIVEIROS, A. T. M.; TAFFAREL, T. R.; LEAL, M. C. Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm. **Neotropical Ichthyology**, DOI: 10.1590/1982-0224-20130207, 2014.

WESTERFIELD, M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of 896 Zebrafish (Danio rerio)*. 3 ed. [s. L.]: Eugene, OR, 1995. [1 v.]

WOOTON, R. J. **Fish and fisheries series 1: ecology of teleost fishes**. New York: Chapman and Hall, 1990. 404 p.