

ESPERMATOGÊNESE E MATURAÇÃO SEXUAL NOS MACHOS DO TUBARÃO-AZUL, *Prionace glauca* LINNAEUS (ELASMOBRANCHII: CARCHARHINIDAE), NAS REGIÕES SUDESTE E SUL DO BRASIL

Spermatogenesis and sexual maturation in male blue shark, *Prionace glauca* Linnaeus (Elasmobranchii: Carcharhinidae), off Southeast and South Brazil

Jorge Eduardo Kotas¹, David Tames², Ana Livia M. Moreira³

RESUMO

No presente estudo detalhou-se a espermatogênese no tubarão-azul, *Prionace glauca*, capturado pela pesca de espinhel-de-superfície, sediada na localidade de Itajaí-SC. O material histológico foi extraído do testículo de um macho adulto com comprimento e peso total de 236 cm e 45 kg respectivamente. Foram realizados cortes transversais de 7µm de espessura e corados em sua maioria com hematoxilina-eosina, sendo alguns com Guímsa. As imagens dos cortes histológicos foram visualizadas e gravadas através de um Sistema de Captação de Imagens. Paralelamente à histologia das gônadas, foi analisada a maturação sexual dos machos através das relações entre o comprimento do clássper e do animal, medidos em cm. Também foi observada a calcificação do clássper. Os dados foram obtidos em viagens de pesca (março-abril/1997, junho-julho/1998, setembro-outubro/1998 e fevereiro de 2002) e em cruzeiros de prospecção com espinhel-de-superfície, durante os meses de março-abril/2003/2006, julho/2003 e setembro/2002/2007 (n = 599). Para esta espécie, foram identificados os sete estágios de desenvolvimento na espermatogênese. Os machos iniciam a calcificação do clássper a partir de 200 cm de comprimento total, estando todos os indivíduos com clássper calcificado além dos 240 cm.

Palavras-chaves: tubarão-azul, *Prionace glauca*, espermatogênese, reprodução.

ABSTRACT

The spermatogenesis in the blue shark, *Prionace glauca*, was observed. This shark is usually caught by surface longliners based in Itajaí, Santa Catarina State, Brazil. The histological samples were extracted from testes of a male (with 236 cm in length and 45 kg in weight). Transversal tissue cuts of 7 µm width were dyed with hematoxiline-eosine and a few with Guimsa. The slides were observed and the images recorded by a video system analyser connected to a microscope. The sexual maturity of this species was also studied through the relationship between clasper and shark length. The clasper calcification was also observed. Data were obtained from commercial fishing cruises (March-April, 1997, June-July, 1998, September-October, 1998 and February, 2002) and from longline research cruises during March-April, 2003 - 2006, July, 2003 and September, 2002 - 2007 (n = 599). For the blue-shark, the seven spermatogenesis stages were detected and described. Males begin clasper calcification from 200 cm and presented claspers fully calcified with 240 cm in total length.

Key words: blue shark, *Prionace glauca*, spermatogenesis, reproduction.

¹ Analista Ambiental, Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste e Sul, CEPESUL, jekotas@gmail.com

² Professor Titular em Histologia Buco-Dental, Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, dtames@univali.br

³ Aluna de graduação do curso de Ciências Biológicas, ênfase em Biotecnologia, Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, analiviamm@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Segundo Ross *et al.* (1993), a espermatogênese é o processo no qual ocorre a produção de espermatozoides. As espermatogônias (2n), derivadas de células germinativas primordiais, sofrem uma série de divisões mitóticas e diferenciação morfológica, ao final das quais são produzidos espermatócitos (2n), os quais se dividem meioticamente e produzem as espermátides (n). Essas células haplóides sofrem diferenciação morfológica acentuada, conhecida como espermiogênese, até derivarem em espermatozoides (Ross *et al.*, 1993; Brancato, 1999; Conrath, 2005). Finalmente é na espermição que ocorre a liberação do espermatozoide nos túbulos eferentes. A divisão meiótica de um espermatócito primário, no macho resulta na formação de 4 (quatro) espermátides haplóides, estruturalmente idênticas, mas geneticamente distintas cada uma com a capacidade de se diferenciar em um espermatozoide.

Nos tubarões, a espermatogênese ocorre nos testículos, sendo regulado pelo hormônio testosterona. Uma detalhada maneira de observar a formação de espermatozoides nos testículos é através de secções histológicas nessas estruturas (Conrath, 2005).

Nos tubarões, a unidade funcional do testículo é o espermatocisto, ou seja, células clones germinativas, denominadas de espermatogônias, associadas as suas respectivas células de Sertoli, dentro de uma unidade esférica, envolta por uma membrana basal (Callard, 1991; Parson & Grier, 1992; Wourms, 1977). Essa estrutura esférica, dentro do testículo, é que sofre a espermatogênese. A espermatogênese inicia na zona germinativa do testículo e termina na degenerativa (Parson & Grier, 1992). Esse tipo de desenvolvimento é conhecido como diametral.

Na espermatogênese de elasmobrânquios (tubarões e raias), foram identificados 7 estágios de desenvolvimento do espermatocisto (Parson & Grier 1992; Maruska *et al.*, 1996), os quais caracterizam a espermatogênese desde o aparecimento das células germinativas, fracamente organizadas, a espermatogônias, espermatócitos, espermátides e finalmente espermatozoides maduros.

O tubarão azul, *Prionace glauca* é considerado o Chondrichthyes mais abundante dos oceanos (Figura 1). Ocorre na zona epipelágica dos mares tropicais, subtropicais e temperados, sendo a sua distribuição fortemente influenciada pelas variações sazonais na temperatura da água, condição reprodutiva e disponibilidade das presas (Kohler *et al.*, 2002). Na costa brasileira ele é mais abundante ao longo das regiões Sudeste e Sul do que no Nordeste (Hazin, 1991). Desde a década de 60 essa espécie tem sido

intensamente capturada como fauna-acompanhante ou espécie-alvo pelas frotas de espinhel-de-superfície de diversos países. Anualmente, são capturados no Atlântico mais de dois milhões de indivíduos dessa espécie (Hazin *et al.*, 2000). Devido às características peculiares do seu ciclo de vida, como a sua viviparidade placentária, esta espécie é especialmente vulnerável a sobrepesca. Conseqüentemente são necessários planos de gestão para a sustentabilidade dessas pescarias e conservação desta valiosa espécie, aliado aos esforços de pesquisa no sentido de definir melhor o seu ciclo reprodutivo e fluxos migratórios (Castro *et al.*, 1999). Existe uma preocupação à nível mundial sobre as populações de grandes predadores marinhos, cujas populações têm sido reduzidas a níveis alarmantes (90 % de redução nos níveis de abundância relativa para algumas espécies de tubarões) durante os últimos 50 anos (Myers & Worm, 2003).

Para o tubarão-azul foram estabelecidas duas populações distintas no Atlântico Sul, ou seja, População I, localizada entre as latitudes de 5° N e 7° S e a População II, entre 20° S e 40° S (Legat & Vooren, 2004). Particularmente, a espécie objeto do presente estudo foi capturada na área da população II. Neste último caso, estudos indicaram haver cópula durante a primavera e verão, ovulação e fertilização no final do verão e outono e finalmente o parto ocorrendo de 9 a 12 meses mais tarde. As áreas de parto e berçário para esta população estariam possivelmente situadas no Atlântico sudeste-central (Amorim, 1992; Guedes *et al.*, 1999, Legat, 2001). Para as fêmeas dessa espécie no Atlântico Sul, o ciclo reprodutivo é anual (Amorim, 1992; Hazin *et al.*, 1994; Hazin *et al.*, 2000; Guedes *et al.*, 1999) (Tabela I).

A ocorrência de cópula, ovulação, fertilização e gravidez com embriões em diferentes estágios de desenvolvimento nas águas das regiões sudeste e

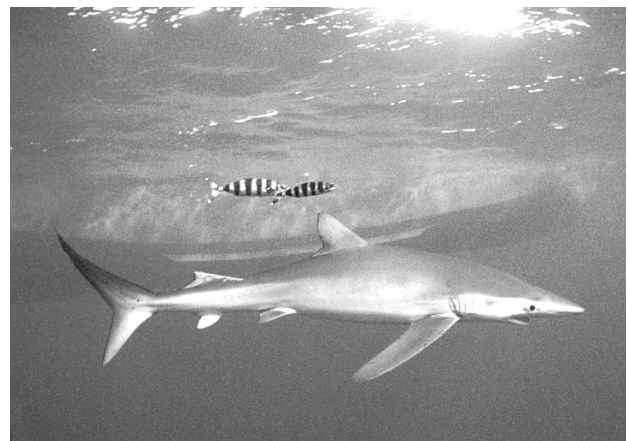


Figura 1 – O tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758). Autor: Guy Marcovaldi, Projeto Tamar.

Tabela I - Resumo do ciclo reprodutivo das fêmeas de *Prionace glauca*, nas regiões Sudeste e Sul do Brasil.

Evento	Comprimento total dos embriões (cm)	Diâmetro dos folículos vitelogenéticos (cm)	Período
Cópula	-	1,5 - 3,0	Novembro - março
Ovulação e fertilização	2 - 6	1,5 a 3	Março - abril
Gestação	10 - 25	0 - 0,2	Março - junho
Gestação	25 - 30	0,2 - 0,5	Outubro - dezembro
Gestação	30 - 35	0,2 - 1,0	Outubro - dezembro
Parto	35 - 50	1,5 - 3,0	Janeiro - março

sul do Brasil, implica que todo o ciclo reprodutivo desta espécie, com exceção do parto, ocorre nessa área. Possivelmente as áreas de parto estejam situadas em águas argentinas e uruguaias e os berçários em águas africanas entre as latitudes de 30° e 40° S (Legat & Vooren, 2004). Por outro lado, no modelo proposto por Hazin (1993) para o ciclo de vida de *P. glauca* no Atlântico sul, a área de parto estaria localizada próxima da Zona de Convergência Subtropical. Após o parto, os filhotes estariam concentrados na costa sul da África, onde permaneceriam até o estágio sub-adulto. Posteriormente, retornariam à costa sudeste do Brasil, onde machos com 7 anos e fêmeas com 6 anos, realizariam a cópula, entre novembro e fevereiro. Após a cópula, as fêmeas migrariam para a costa do nordeste, onde realizariam a ovulação e fertilização dos óvulos, iniciando a gestação 3 meses após a cópula, entre fevereiro e junho. As fêmeas migrariam da costa nordestina para a área de parto durante um período de 1 ano, correspondente à gestação. Hazin & Pinheiro (1997), a partir de análises histológicas dos testículos dos machos de tubarão-azul, indicaram a ocorrência de um ciclo sazonal de espermatogênese para a espécie, além de proporem uma nova rota migratória baseada em dados recentes sobre o tamanho dos embriões obtidos no Golfo de Guiné (Castro & Mejuto, 1995).

No presente estudo foi descrita a espermatogênese de *Prionace glauca*, comumente conhecido como tubarão-azul ou mole-mole, e que é capturado comercialmente pela frota de espinhel-de-superfície, sediada na localidade de Itajaí-SC.

MATERIAL E MÉTODOS

O material histológico utilizado no presente estudo foi extraído do testículo de um macho de tubarão-azul, *Prionace glauca* e as informações biológicas-pesqueiras deste exemplar foram as seguintes:

Nº. amostra #1268

Data da captura: 17/09/2007

Local da captura: 29°00'805''S - 47°18'125''W
 Tipo de aparelho de pesca: espinhel-de-superfície
 Embarcação de pesquisa: N.Pq. Soloncy Moura
 Temperatura da água de superfície: 20,1 °C

Sexo: macho

Comprimento total: 236 cm

Comprimento furcal: 190 cm

Peso total: 45 kg

Estágio de maturação: Maduro

Testículo - Largura: 5,9 cm; Comprimento: 16,5 cm

Comprimento do cláspere (margem interna): 20,5 cm

Condição do cláspere: calcificado

Peso do fígado - 1 kg

Condição do animal capturado: vivo

Foram realizados três cortes transversais de 5 mm nos testículos do supracitado exemplar (nas regiões apical, central e distal da gônada), utilizando-se facas de microtomia descartáveis. As peças foram inicialmente fixadas em formol 10%. Posteriormente, submetidos à desidratação progressiva em banhos de álcool de concentração crescente (70%, 90% e 100%), trocados a cada oito horas. A seguir foram diafanizados com 3 banhos de trinta minutos, cada um, em xilol. Finalmente efetuou-se a inclusão em parafina fundida dentro de uma estufa a 60 °C. Após o esfriamento da parafina, os blocos com tecidos foram cortados em um micrótomo Bright 5040, obtendo-se cortes com 7µm de espessura. Finalmente, coraram-se a maioria dos cortes com hematoxilina e eosina e alguns com Guimsa e analisados em microscópio de luz transmitida; os espécimes mais representativos foram documentados com fotomicrografias obtidas com fotomicroscópio óptico binocular Olympus BX50, as análises das imagens foram feitas através de um software *Image Pro Plus*.

O estudo da maturação sexual nos machos de *Prionace glauca* foi realizado através da análise das relações entre o comprimento da margem interna do cláspere vs. o comprimento total e o comprimento furcal, medidos em cm. Estas medidas foram

efetuadas como projeção vertical, com a nadadeira caudal alinhada em relação ao eixo horizontal do corpo (Compagno, 1984). Durante as medições, foi também avaliada a condição do clássper, ou seja, se o mesmo se apresentava calcificado ou não. Todas essas observações foram obtidas em quatro viagens de pesquisa a bordo da embarcação pesqueira de espinhel-de-superfície Yamaya III durante os meses de março-abril/1997, junho-julho/1998, setembro-outubro/1998 e fevereiro de 2002. Também foram obtidos dados em 3 cruzeiros de prospecção com espinhel-de-superfície à bordo do N.Pq. Soloncy Moura, durante os meses de março-abril/2003/2006, julho/2003 e setembro/2002/2007. Foram feitas observações em 599 indivíduos.

RESULTADOS

O testículo do tubarão-azul é do tipo poliespermatocístico, já que internamente é formado por inúmeras estruturas esféricas, denominadas de espermatocistos, em diferentes estágios de desenvolvimento. Entre os agrupamentos de espermatocistos, se observam trabéculas de tecido conjuntivo. O espermatocisto internamente é formado por inúmeras células germinativas (espermatogônias) denominadas de "clones". Essas células é que irão sofrer todo o processo de espermatogênese até se transformarem em espermátides e finalmente espermatozóides. Além das células germinativas, são visualizadas células maiores, as de Sertoli, que coram com hematoxilina. A seguir, são apresentadas essas estruturas, bem como os estágios da espermatogênese observados nos cortes histológicos dos testículos do tubarão-azul.

Estágio I - logo abaixo do epitélio, na zona germinativa da gônada, se observam várias associações entre espermatogônias primárias e suas respectivas células de Sertoli e que envolvem as primeiras com seus prolongamentos citoplasmáticos. Essas associações, pelo fato de não possuírem uma membrana basal, ainda não podem ser denominadas de espermatocistos. As espermatogônias primárias apresentam citoplasma visível e um núcleo com cromatina granular. Por sua vez, as células de Sertoli apresentam um núcleo achatado, com nucléolo densamente corado (Figura 2).

Estágio II - a camada de espermatogônias e associadas células de Sertoli se dividem por mitose, rodeiam o lúmen central e são envolvidas por uma membrana basal, formando o espermatocisto. Essa configuração é bem nítida no aumento de 40X. Neste caso também é possível observar a associação entre a célula de Sertoli e as espermatogônias secundárias

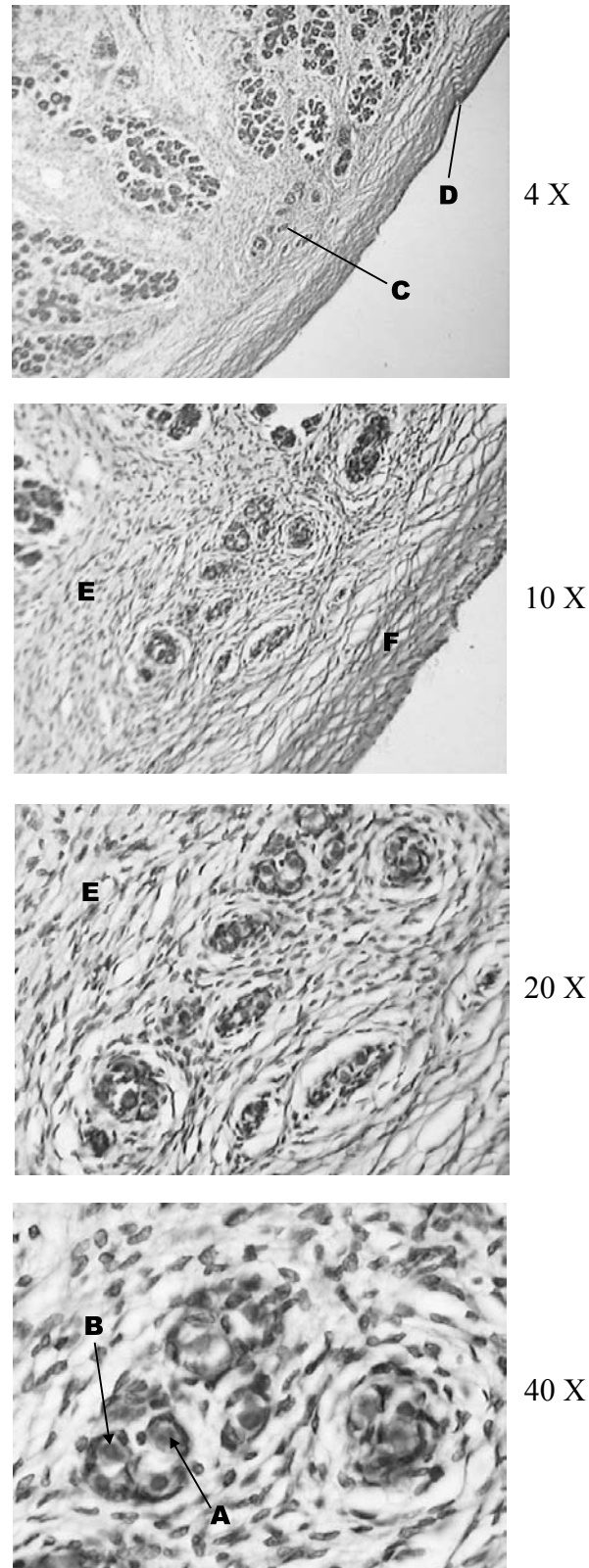


Figura 2 - Estágio I da espermatogênese. Aumento de 4, 10, 20, 40 X. Corado com Hematoxilina e Eosina. A - Espermatogônia; B - Célula de Sertoli; C - Zona Germinativa; D - Epitélio; E - Tecido Conjuntivo Frouxo; F - Tecido Conjuntivo Fibroso.

formando o que se denomina de espermatoblasto. No estágio II, as células de Sertoli revestem o lúmen do espermatocisto, enquanto as espermatogônias secundárias se localizam na periferia (Figura 3).

Estágio III - a espermatogônia sofre mitose para se tornar espermatócito primário, os quais então sofrem a primeira divisão meiótica para se tornarem espermatócitos secundários. São visualizadas estruturas esféricas, denominadas de espermatocistos. Nesse estágio, as células de Sertoli já migraram para a periferia do espermatocisto. Ao redor dos espermatocistos, se observam trabéculas de tecidos conjuntivos escassos, com vasos sanguíneos, pequenas células redondas (intersticiais ou de Leydig), fibroblastos e fibrócitos. É possível visualizar as células germinativas denominadas espermatogônias ao longo do espermatocisto e uma sutil diferenciação na coloração da parede do mesmo, indicando que já

houve a migração das células de Sertoli para a periferia (Figura 4).

Estágio IV - os espermatocistos em estágio IV aparecem com uma trabécula de tecido conjuntivo que se irradiou da zona germinativa do testículo, e os espermatócitos secundários se convertem em espermátides, devido à meiose II ou divisão equacional. As células de Sertoli se encontram na periferia. A periferia do espermatocisto escurece em função das espermátides condensarem a cromatina. Já começa a se observar a formação das caudas dos espermatozóides na região central do espermatocisto. Ao redor dos espermatocistos, também se observam tecidos conjuntivos escassos, com vasos sanguíneos, pequenas células redondas (intersticiais ou de Leydig), fibroblastos e fibrócitos. A partir deste estágio haverá a diferenciação até espermatozóides através da espermiogênese (Figura 5).

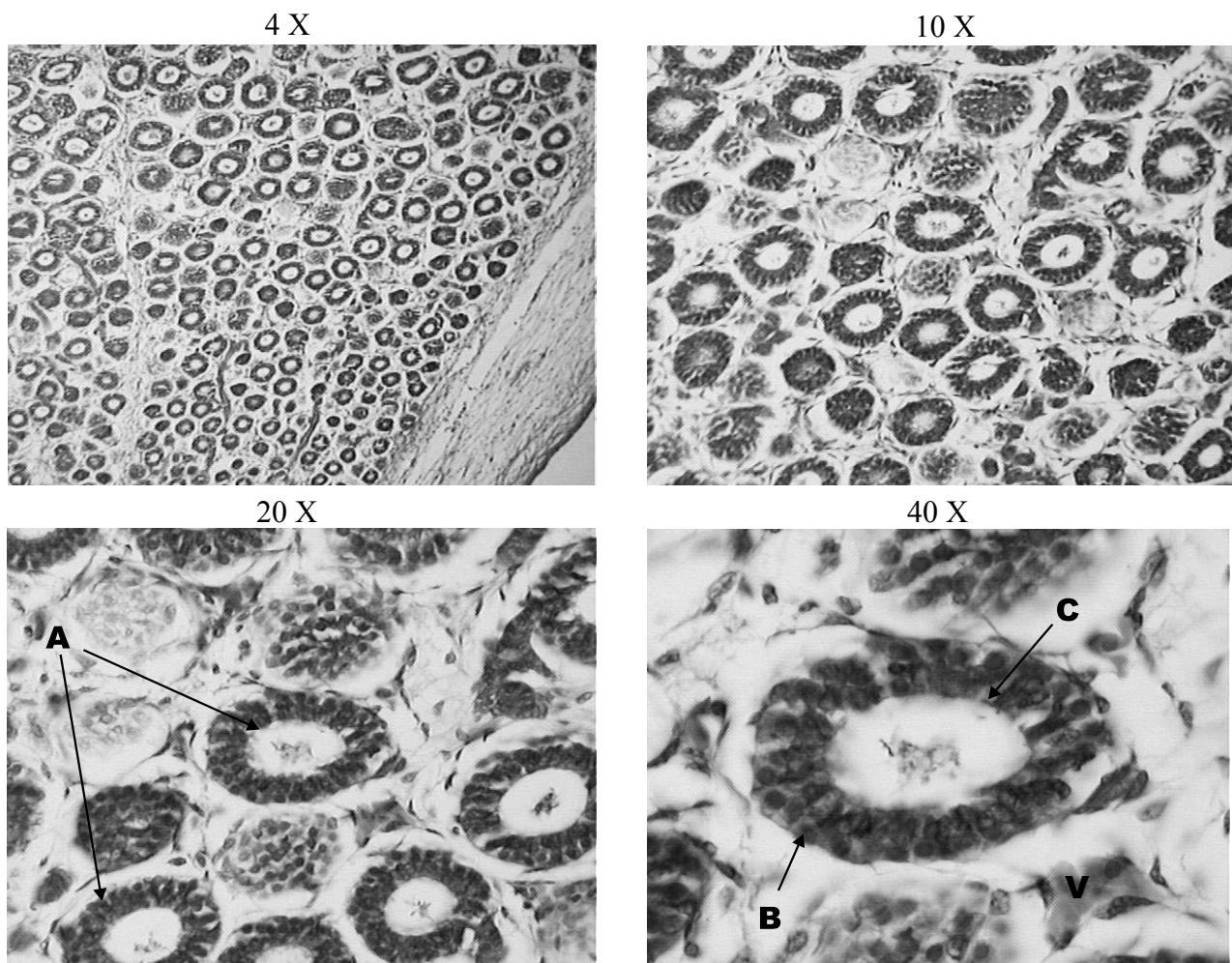


Figura 3 - Estágio II da espermatogênese. Aumento de 4, 10, 20, 40 X. Corado com Hematoxilina e Eosina. Nas fotografias superiores, à esquerda e à direita, vista panorâmica dos espermatocistos. A - Espermatocisto; B - Espermatogônia; C - Célula de Sertoli; V - Vaso sanguíneo.

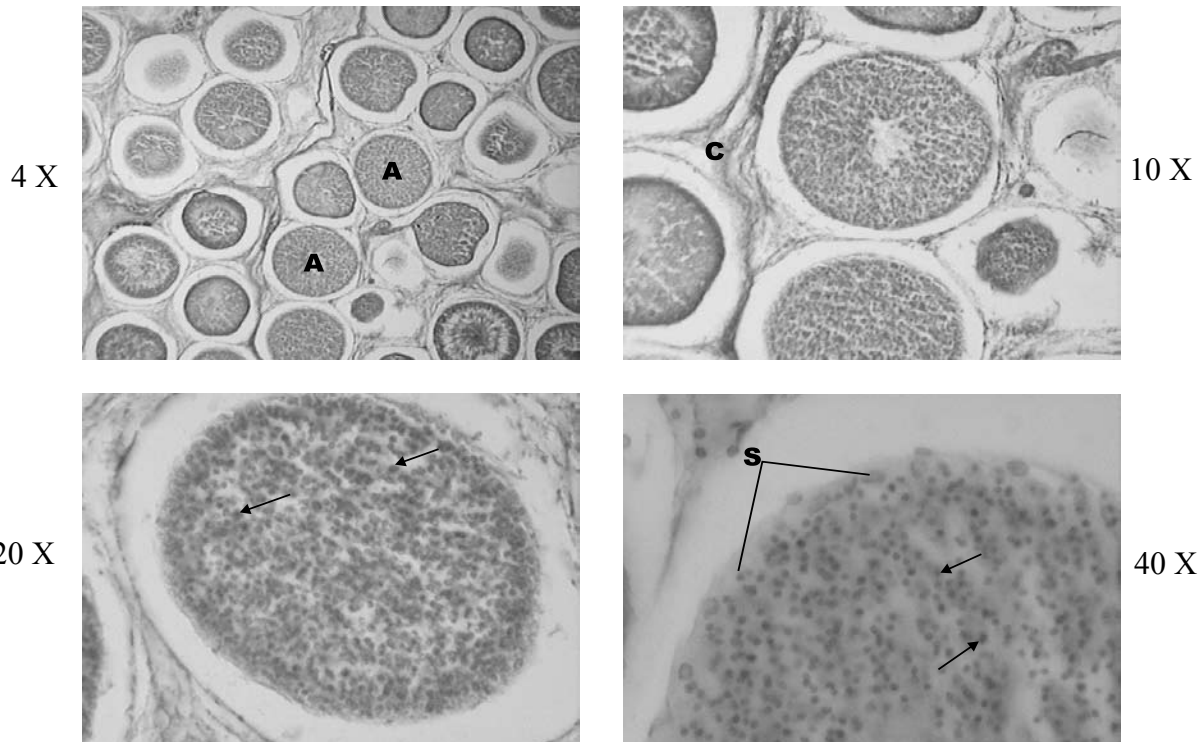


Figura 4 Espermatocistos em estagio 3 e células de sertoli. Aumento de 4, 10 e 20 X, corados com Hematoxilina e Eosina. Aumento de 40 X, corado com Hematoxilina. A - Espermatocisto; C - Tecido conjuntivo nos interstícios dos espermatocistos; S - Células de Sertoli que já migraram para a periferia do espermatocisto. Setas indicam espermatogônias.

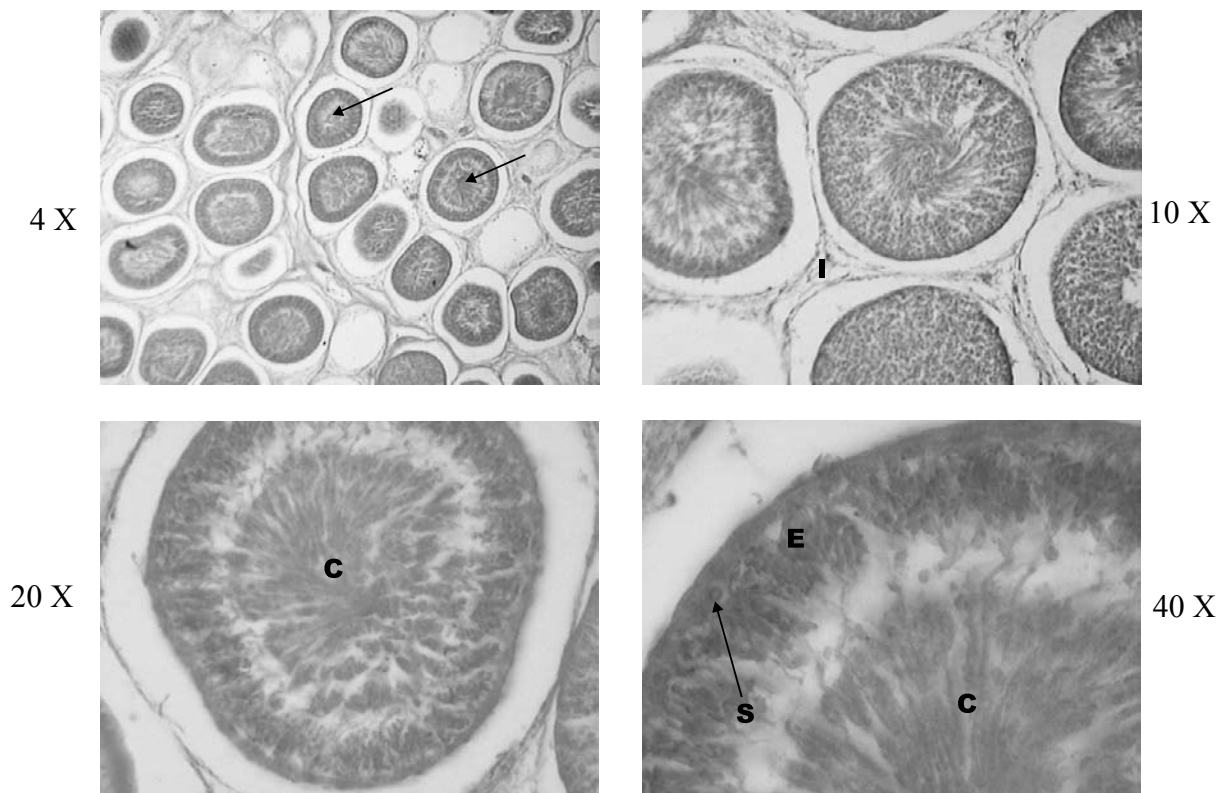


Figura 5 - Espermatocistos em estagio 4 (setas). Aumento de 4, 10, 20 e 40 X. Corados com Hematoxilina e Eosina. I - tecido intersticial (conjuntivo frouxo); E - Espermátides; C - caudas dos espermatozóides; S - Célula de Sertoli.

Estágio V - o espermatocisto no estágio V encontra-se repleto de espermatozóides imaturos e as cabeças, estas espiraladas, estão alinhadas paralelamente e distribuídas ao longo da periferia do espermatocisto. As caudas dos espermatozóides se estendem em direção ao lúmen do espermatocisto. Observam-se os espermatoblastos, formados cada um por uma célula de Sertoli, onde são inseridos os espermatozóides, mas os espermatozóides ainda não se organizaram em “pacotes”. Ao redor dos espermatocistos também é visto o revestimento de células delgadas. Entre os espermatocistos também se observa o tecido conjuntivo frouxo, com pequenos capilares, células redondas (intersticiais ou de Leydig), fibroblastos e fibrócitos (Figura 6).

Estágio VI - o espermatocisto no estágio VI apresenta os espermatozóides com as cabeças fortemente empacotadas (espiraladas) e inseridas na célula de Sertoli, compondo-se assim um espermatoblasto. Com essa configuração, muito peculiar, os espermatozóides estão prontos para a sua liberação (espermiação). As caudas dos espermatozóides aparecem enroladas entre si, em direção ao lúmen do espermatocisto (Figura 7). Entre os espermatocis-

tos também se observa o tecido conjuntivo frouxo, com pequenos capilares, células redondas (intersticiais ou de Leydig), fibroblastos e fibrócitos. Nesse estágio, as cabeças dos espermatozóides coram bem com a hematoxilina e as caudas com a eosina. Em geral a partir do estágio 6 é que ocorre a cópula nos elasmobrânquios.

Estágio VII - esse estágio ocorre na zona degenerativa do testículo. Ali há um grande número de espermatocistos parcialmente vazios e/ou em processo de reabsorção. Dentro dos espermatocistos é possível distinguir restos de material reprodutivo (cabeças e caudas de espermatozóides) e células de Sertoli (grandes núcleos roxos). Entre os espermatocistos se distribui o tecido conjuntivo frouxo, com vasos sanguíneos, fibroblastos, fibrócitos e pequenas células intersticiais (ou de Leydig). Ao redor dos espermatocistos é possível observar o revestimento de células delgadas. No tecido conjuntivo, aparece um vaso sanguíneo bem nítido e com hemácias (Figura 8). De acordo com Conrath & Musick (2002), este estágio seria degenerativo, constituído de espermatocistos vazios, com espermatogônias e espermatozoides livres.

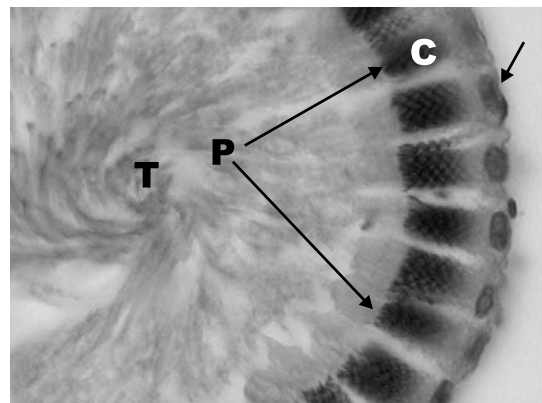
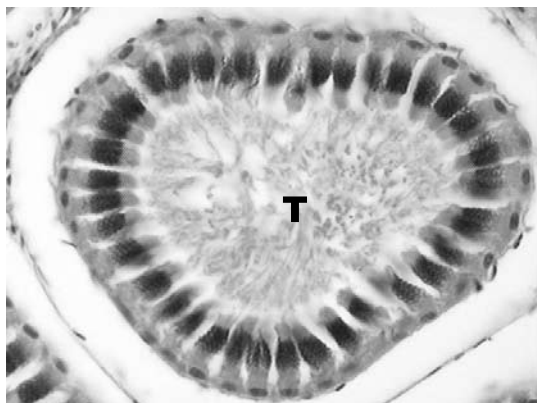
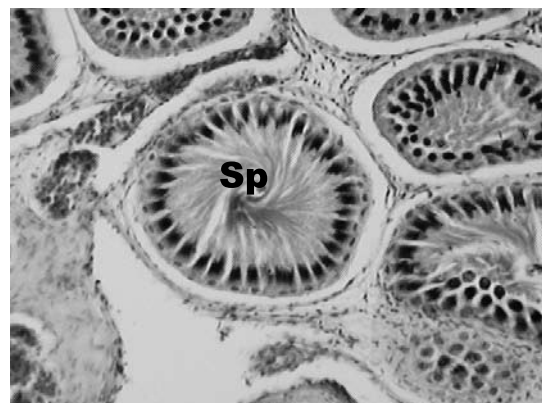


Figura 6 - Espermatocistos em estagio 5 (Sp). Aumento de 4, 10, 20 e 40 X. Corados com Hematoxilina e Eosina. C - Cabeças espiraladas de espermatozóides imaturos; T - Caudas dos espermatozóides estendidas em direção ao lúmen do espermatocisto; Células de Sertoli (setas); P - peças intermediárias dos espermatozóides.

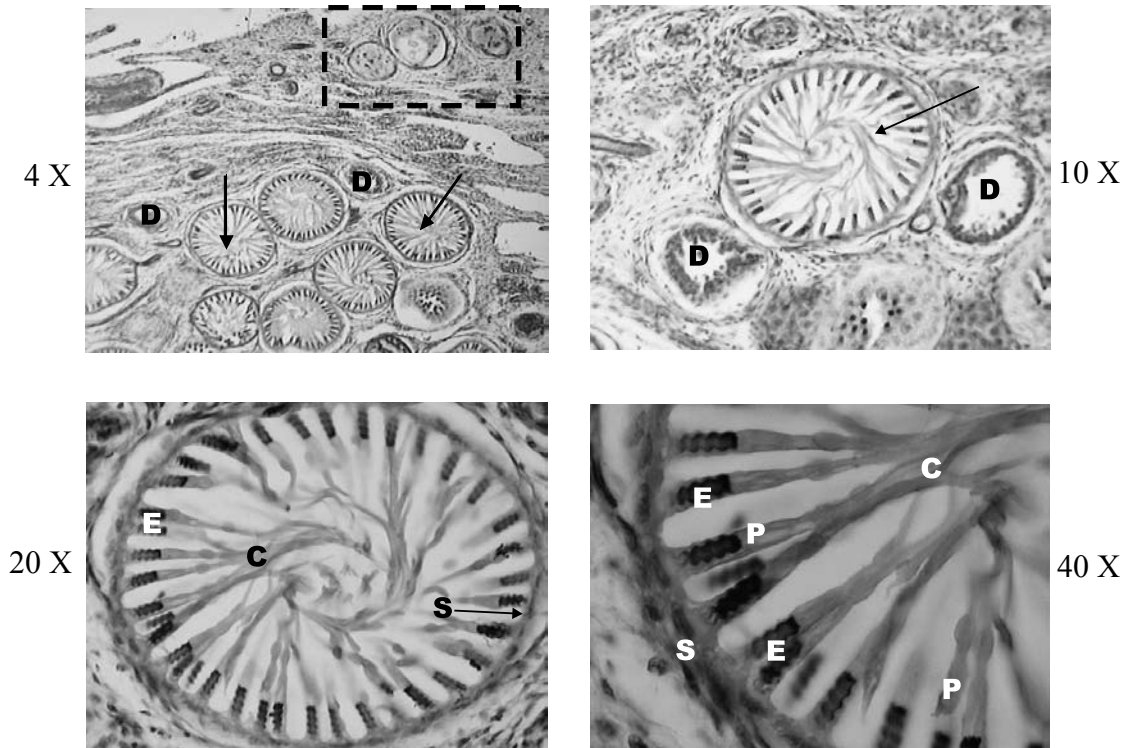


Figura 7 - Espermatocistos em estagio 6 (setas pretas). Aumento de 4, 10, 20 e 40 X. Corados com Hematoxilina e Eosina. E - Cabeças dos espermatozóides fortemente empacotadas; P - Peças intermediárias dos espermatozóides; C - Caudas dos espermatozóides; S - Células de Sertoli. Linha tracejada indica a zona degenerativa.

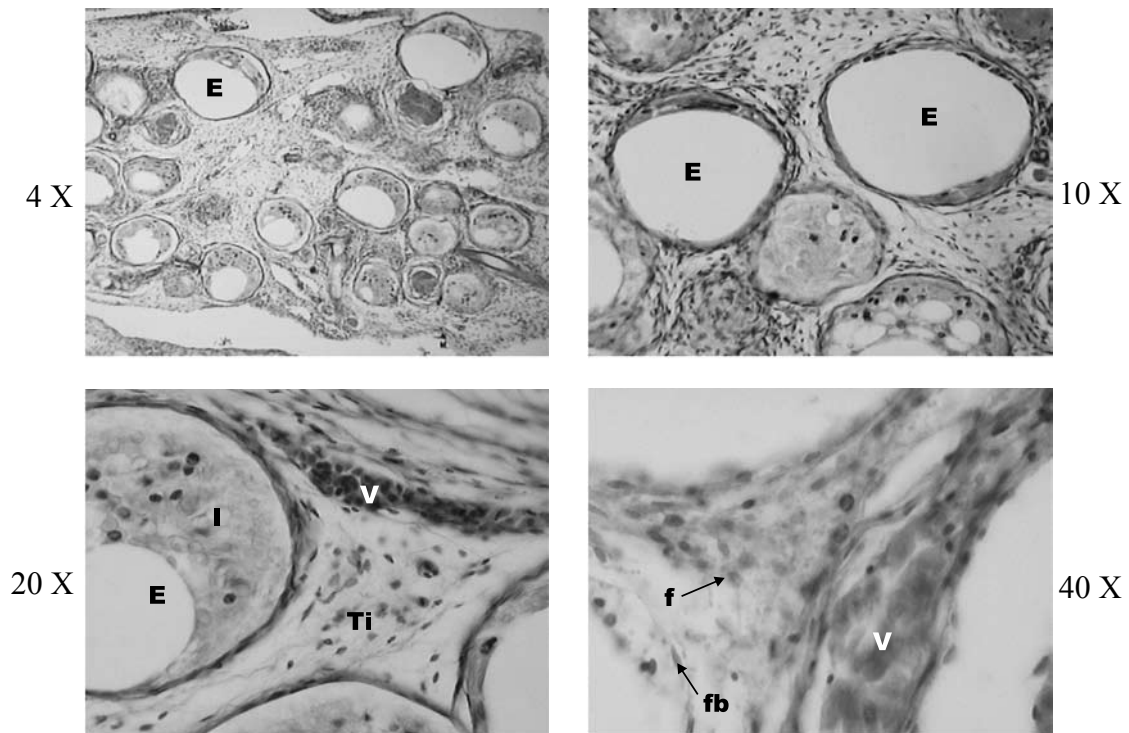


Figura 8 - Espermatocisto em estagio VII . Aumento de 4, 10, 20, 40 X. Corado com Hematoxilina e Eosina. E - espermatocistos em fase degenerativa com restos de material reprodutivo (r); Tecido intersticial de tecido conjuntivo frouxo (Ti) contendo vasos sanguíneos (v), fibroblastos (f), fibrócitos (fb) e células de leydig (setas).

Zona Degenerativa e Órgão Epigonal - na metade superior é possível observar o tecido linfomieloide do órgão epigonal, que rodeia parte do testículo (Figura 9). O tecido linfomieloide é intensamente preenchido por leucócitos, sendo, portanto um importante órgão produtor de sangue e imunológico. Ali também ocorrem vasos sanguíneos com eritrócitos, sendo os vasos forrados por epitélio simples pavimentoso. Já na metade inferior, se observa a zona degenerativa do testículo.

Os resultados sobre a maturidade sexual indicaram que os machos começam a apresentar o clássper calcificado a partir de 200 cm de comprimento total, estando todos os indivíduos com clássper calcificado além dos 240 cm. Portanto o tamanho médio de maturação sexual se encontra no intervalo de 200 a 240 cm (Figura 10). Por sua vez, considerando o comprimento furcal, a maturidade iniciaria a partir de 160 cm, estando todos os indivíduos com clássper calcificado a partir de 205 cm de comprimento furcal (Figura 10).

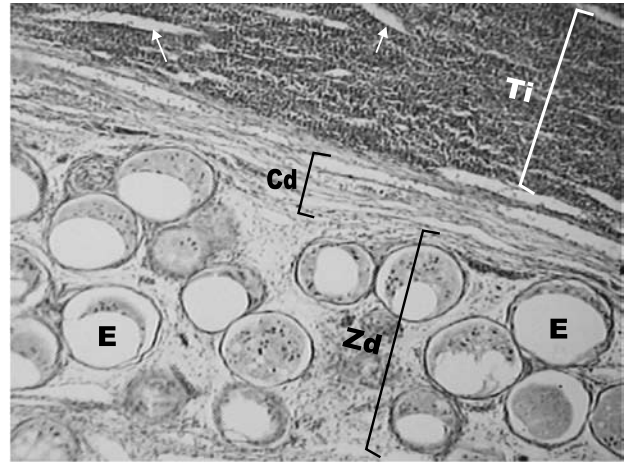


Figura 9 - Espermatocistos em estagio VII e órgão epigonal. Aumento de 4 X. Corado com Hematoxilina e Eosina. Ti - Tecido linfomieloide do órgão epigonal com leucócitos; Cd - Cápsula de tecido conjuntivo denso; Zd - Zona degenerativa; E - espermatocistos em processo degenerativo. As setas indicam vasos sanguíneos com eritrócitos.

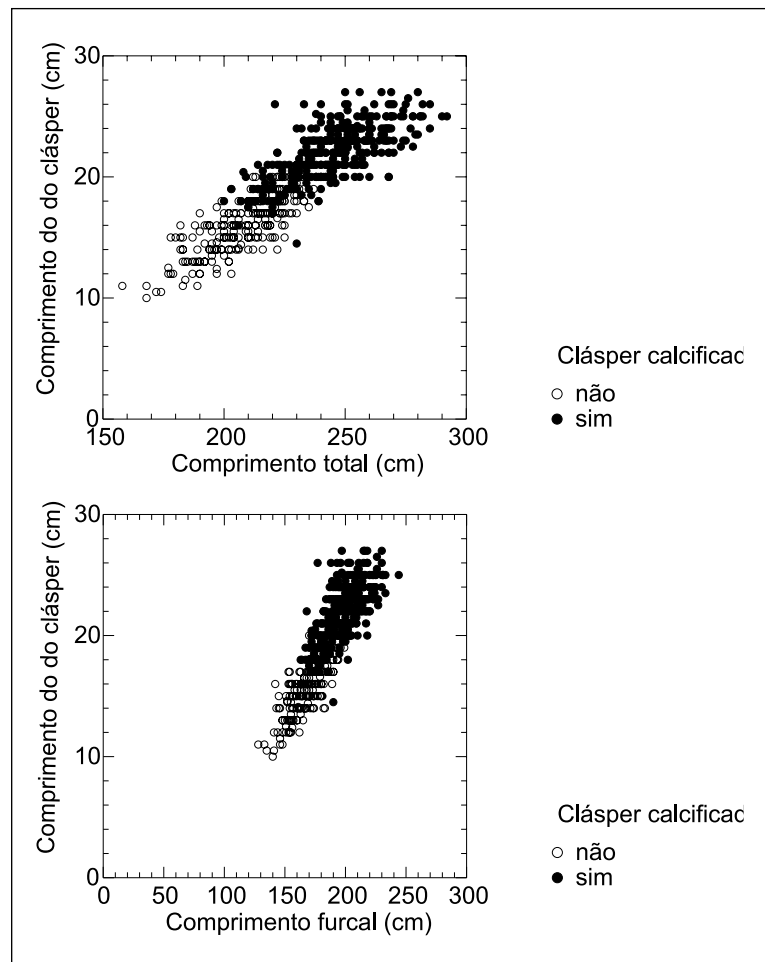


Figura 10 - Curvas de maturação sexual para os machos de *Prionace glauca* capturados na pesca de espinhel-de-superfície (n = 599).

DISCUSSÃO

Nos humanos, a espermatogênese se inicia na região periférica (basal) dos túbulos seminíferos e, à medida que as espermatogônias se transformam em espermatócitos e em espermatídes, pelos processos mitóticos e meióticos, estes são lançados como espermatozoides no lúmen desses túbulos. Por sua vez, nos tubarões, durante a espermatogênese as células germinativas e as de Sertoli, migram da região central (lúmen) do espermatocisto, em direção à periferia do mesmo, sendo os espermatozoides eliminados através de um longo e fino túbulo eferente, e transportados para o epidídimo através de uma região membranosa denominada de mesórquio. Os espermatocistos, à medida que sofrem espermatogênese, migram da região germinal do testículo, esta mais dorsal, em direção à zona degenerativa, mais ventral (Hara & Tanaka, 1990; Brancato, 1999). No estágio final da espermatogênese, os “pacotes” de espermatozoides se desagregam (Figura 7). Os seres humanos não apresentam essa estrutura peculiar denominada de espermatocisto.

Nos tubarões, as células germinativas são de origem endodérmica e o pico do desenvolvimento testicular nem sempre coincide com a época de cópula (Parsons & Grier 1992).

As células de Sertoli criam micro ambientes para o desenvolvimento e a diferenciação das células espermatogênicas, mediando os movimentos de esteróides, metabólitos e nutrientes, e oferecem suporte, proteção e nutrição aos espermatozoides em desenvolvimento. As células de Sertoli, fagocitam corpos residuais extras como células espermatogênicas degeneradas e citoplasma que se desprende das espermatídes na fase de diferenciação. Através de junções de oclusão, entre células de Sertoli adjacentes, funcionam como barreira hemotesticular evitando interações entre os espermatozoides e o sistema imunológico. Secretam várias substâncias estimuladoras e inibidoras, que participam da regulação da mitose, da meiose e das funções esteroidogênicas das células de Leydig. Também controla os movimentos das células espermatogênicas e a liberação dos espermatozoides. Elas conferem uma organização estrutural nos túbulos seminíferos do homem e nos espermatocistos dos tubarões. Apresentam formato cilíndrico ou piramidal, envolvendo parcialmente, com seus prolongamentos laterais e apicais complexos, as células germinativas. O núcleo é geralmente triangular e há um nucléolo proeminente, bem evidente (Junqueira & Carneiro, 2004; Ross *et al.* 1993, Brancato 1999). É interessante observar que as células de Sertoli, diferente das células espermatogênicas,

constituem uma população que não prolifera, sendo compostas por um único tipo celular. Elas se mantêm com um tamanho consistente ao longo do ano, como é o caso de *Hemiscyllium ocellatum*, que mantém um diâmetro entre 0,7 a 1,0 μm (Heupel, 1999). Já as espermatogênicas, constituem uma população em proliferação, compostas por células em várias fases de diferenciação através de mitoses e meioses (Ross & Romrell, 1993). No presente trabalho, a configuração complexa das células de Sertoli não pode ser vista claramente com a coloração rotineira com hematoxilina e eosina. Ao microscópio ótico, não foi possível definir a morfologia dos prolongamentos laterais e apicais da célula de Sertoli. O núcleo da célula de sertoli contém cromatina finamente dispersa. Pode ser achatado, situando-se na porção basal da célula, como é o caso do tubarão-azul no estágio 6 da espermatogênese, ou pode ser triangular ou ovóide, situado perto de alguma distância da membrana basal, como no estágio 3 (Figuras 4 e 7). Na Figura 7 foi possível visualizar os complexos funcionais entre as células de Sertoli. Esses dispositivos constituem fortes dispositivos de aderência, que mantêm as células adjacentes unidas (Ross & Romrell, 1993). Esses dispositivos são constituídos por feixes de microfibrilas e retículo endoplasmático associado. Possivelmente esses dispositivos existam também entre as células de Sertoli e as espermatídes.

Comparando os mamíferos com os tubarões, se observa que no primeiro grupo, uma única célula de Sertoli nutre de três e quatro sucessivas gerações de células germinativas. Já nos tubarões de profundidade como, *Squalus acanthias*, *Centroscyminus coelolepis*, *Centrophorus squamosus* e nos tubarões pelágicos com é o caso de *Prionace glauca*, uma única coorte de células de Sertoli permanece associada com uma única geração de células germinativas ao longo de seu desenvolvimento, sendo que os diferentes estágios celulares germinativos estão topograficamente e diametralmente segregados dentro do testículo (Dubois & Callard, 2005; Girard *et al.*, 2000).

As células intersticiais ou de Leydig são células endócrinas, produtoras de hormônios esteróides, entre os quais a testosterona, hormônio masculino responsável pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas, do trato genital e regulador da espermatogênese. São células arredondadas ou poligonais, com um núcleo central e um citoplasma eosinófilo rico em pequenas gotículas de lipídeos. Ao que parece, o número dessas células é constante e não diminui na fase adulta. A nível ultra-estrutural, a característica mais marcante nessas células é a presença de retículo endoplasmático agranular, característico de células secretoras esteróides (Jun-

queira & Carneiro, 2004; Ross *et al.*, 1993; Brancato, 1999) (Figura 8).

Um detalhe morfológico interessante observado durante os estágios V e VI da espermatogênese no tubarão-azul, é o fato dos “pacotes” de espermatozoides estarem regularmente arranjados, com as cabeças viradas em direção à membrana basal do espermatozócito (Figuras 6 e 7). Esses “pacotes” de espermatozoides estão compostos de aproximadamente 64 espermatozoides. Esse padrão de distribuição espacial, também foi encontrado em outras espécies de tubarões, com é o caso de *Carcharhinus falciformis*, *Centroscymnus owstoni*, *Chlamydoselachus anguineus*. Ao contrário, nas raias os “pacotes” não estão regularmente arranjados no folículo e se encontram dissociados nos estágios finais da espermatogênese, como é o caso de *Dasyatis kuhlii*, *Dasyatis garouanensis* e *Pteroplatytrygon violacea*. Por sua vez na quimera, *Chimaera phantasma*, o espermatozócito e os “pacotes” de espermatozoides, são morfológicamente semelhantes aos dos tubarões (Hara & Tanaka, 1990; Kotas comunicação pessoal).

Os espermatozoides nos condrichthyes medem entre 110 e 150 µm de comprimento total. São compostos de uma cabeça, pescoço e cauda. A configuração espiralada dos mesmos, possivelmente lhes possibilita vantagens de movimentação no meio em que vivem, como movimentos para frente e de ré (Wourms, 1977). A cabeça é composta de grânulos nucleares comprimidos de alta densidade eletrônica. O pescoço por sua vez, é rodeado por 5 a 6 mitocôndrias (Hara & Tanaka, 1990). A cauda consiste de um flagelo e colunas longitudinais. Nos tubarões, duas colunas longitudinais são vistas em ambos os lados do flagelo. As raias também apresentam essas duas colunas longitudinais, mas seus formatos são arredondados em vez de ovalados. Nas quimeras apenas uma coluna longitudinal arredondada está presente.

As diversas espécies de elasmobrânquios apresentam variações no seu ciclo reprodutivo anual, ou seja, (1) podem ser reprodutivamente ativos ao longo do ano, como é o caso de *Raja montagui*, (2) podem apresentar um ciclo anual pobremente definido, com um ou dois picos de atividade, ou (3) ter um ciclo anual ou bianual bem definido como é o caso de *Sphyrna tiburo* e *Carcharhinus limbatus* (Wourms, 1977; Nolan *et al.*, 2002). No caso de *Prionace glauca*, no sul do Brasil, diversos autores sugerem a existência de um ciclo reprodutivo anual, ocorrendo a cópula durante a primavera e o verão, a ovulação e fertilização entre o final do verão e o outono, seguida pelo nascimento dos neonatos 9 a 12 meses mais tarde (Legat & Voooren, 1998). Nos rajideos, as gônadas continuamente

produzem gametas e os adultos são teoricamente capazes de desovar ao longo de todo o ano, havendo picos de atividade reprodutiva (Richards *et al.*, 1963; McEachran, 1970; DuBuit, 1976; Palmer, 1985 apud Nolan *et al.*, 2002). Exame histológico em testículos de *Hemiscyllium ocellatum* mostrou um ciclo sazonal de produção de esperma. Os testículos se apresentavam inativos quando as concentrações do hormônio andrógeno eram mais baixas. Várias espécies de tubarões apresentam um ciclo anual de regressão testicular, como é o caso de *Sphyrna tiburo*, enquanto algumas espécies apresentam todos os sete estágios espermatogênicos presentes ao longo do ano (Parsons & Grier, 1992).

Uma característica muito peculiar no sistema reprodutivo dos elasmobrânquios é a presença de órgão epigonal em machos e fêmeas. Este órgão apresenta tecidos linfóide e hemopoiético (Wourms, 1977) (Figura 9) mas, em algumas espécies de tubarões de profundidade, como é o caso de *Centroscymnus coelolepis* e *Centrophorus squamosus*, não foi observado (Girard *et al.*, 2000).

Os 7 estágios da espermatogênese, descritos por Maruska *et al.* (1996), além de terem sido estudados em *Prionace glauca* no presente estudo e por Brancato (1999), também foram observados em outras espécies de tubarões, como é o caso de *Hemiscyllium ocellatum*, nos recifes de corais da Austrália (Heupel *et al.*, 1999).

A nível histológico, a maturidade sexual em elasmobrânquios machos é definida pela presença de espermatozoides nos espermatozócitos dos testículos (Nolan *et al.*, 2002). O exemplar em questão analisado apresentou espermatozócitos nessa situação e, portanto pode ser considerado como maduro. Tradicionalmente, os estágios de maturidade sexual têm sido identificados em função da morfologia externa do cláspere e do desenvolvimento gonadal interno (Stehmann, 1987; Nolan *et al.*, 2002). O processo de desenvolvimento do cláspere é peculiar para cada espécie e pode ser expresso por uma abrupta ou gradual transição do tamanho dessa estrutura com a maturidade (Pratt, 1979; Gallagher, 2000 apud Nolan *et al.*, 2002). A calcificação no cláspere também é uma maneira de determinar a maturidade sexual e tem sido utilizada em várias espécies como *Rhizoprionodon terranova* (Parsons, 1983), *Prionace glauca* (Pratt, 1979), *Scyliorhinus retifer* (Castro *et al.*, 1988), *Carcharhinus plumbeus* (Joung & Chen, 1995) e *Sphyrna tiburo* (Maniri & Rasmussen, 1997). O acúmulo de esperma no epidídimo também é um indicativo de maturidade em elasmobrânquios (Heupel *et al.*, 1999). A histologia é uma ferramenta poderosa para aferir as observações sobre maturidade sexual a ní-

Tabela II - Resultados de alguns estudos sobre a maturidade sexual de *Prionace glauca* no Atlântico Sul e Mediterrâneo.

Referência	N	Localidade	Tamanho de maturação sexual (cm)	Idade na 1ª maturação sexual
Megalofonou <i>et al.</i> (2005)	323 machos 179 fêmeas	Mar Mediterrâneo	Machos 162,8 Fêmeas 156,3	5 anos (machos) 6 anos (fêmeas)
Grotenberg & Vooren (1999); Legat & Vooren (2004)	167 machos 60 fêmeas	Atlântico Sul	Machos a partir de 210 (> de 249, todos maturos) Fêmeas a partir de 195 (> de 240, todos maturos)	4 -7 anos (machos) 3,5 -7 anos (fêmeas)
Schwingel & Mazzoleni (2004)	38 machos 55 fêmeas	Atlântico Sul	Machos maturos entre 120 e 265 Fêmeas maturas entre 125 e 240	-
Presente estudo	599 machos	Atlântico Sul	Machos a partir de 200 (> de 240, todos maturos)	-

vel macroscópico (Wourms, 1977). Observações histológicas efetuadas em *Raja montagui* mostraram que espermatozoides maturos são encontrados em machos que ainda não desenvolveram completamente a cartilagem do cláspere e isto implica que ocorre a maturidade fisiológica a um menor tamanho do que a maturidade funcional, esta última normalmente evidenciada a nível macroscópico pelo crescimento do cláspere ou mesmo das estruturas gonadais (Nolan *et al.*, 2002).

A título de comparação com o presente estudo, são apresentados os resultados de alguns trabalhos sobre a maturação sexual do tubarão-azul (Tabela II).

Os resultados sobre maturidade sexual se assemelharam aos obtidos por Grotenberg & Vooren (1999), Legat & Vooren (2004), porém com uma diferença aproximada para menos de 10 cm nas medidas de comprimento total.

Agradecimentos - Ao Dr. Luiz Fernando Rodrigues do CEPSUL e a Dra. Roberta Aguiar dos Santos, que possibilitaram a realização deste trabalho em parceria com a Univali. Um especial agradecimento as Srtas. Vanessa Aparecida Brandalise (auxiliar de laboratório), Beatriz Pacheco (Técnica em laboratório), Maria de Lourdes Correia (auxiliar de laboratório), pela inestimável ajuda e amizade durante o período de execução desta pesquisa no laboratório de Pesquisa 1 da Faculdade de Odontologia da Univali.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorim, A.F. *Estudo da biologia da pesca e reprodução do cação-azul, Prionace glauca L. 1758, capturado no*

sudeste e sul do Brasil. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 205p. Rio Claro, SP, 1992.

Brancato, C.L. *Morfologia funcional do aparelho reprodutor masculino do tubarão-azul Prionace glauca (Linnaeus, 1758)*. Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 82 p. Rio Grande, RS, 1999.

Brander, K. & D. Palmer. Growth rate of *Raja clavata* in the north east Irish Sea. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, n. 42: 125-128, 1985.

Callard, G.V. Spermatogenesis, p. 303-341, *In* P. Pang & M. Schreibman (eds.), *Vertebrate endocrinology: fundamentals of biomedical implications*, Vol. 4., Part A. Academic Press, San Diego, 1991.

Castro, J.I.; Bubucis, P.M. & Overstrom, N.A. The reproductive biology of the chain dogfish *Scyliorhinus rotifer*. *Copeia*. 740-746, 1988.

Castro, J.A. & Mejuto, J. Reproductive parameters of blue shark, and others sharks in the Gulf of Guinea. *Mar. Fresh. Res.*, n. 46: 967-973, 1995.

Castro, J.L.; Woodley, C.M. & Brudek, R.L. A preliminary evaluation of the status of the shark species. *FAO Fish. Tech. Paper*, n.380, 72 p., 1999.

Compagno, L.J.V. *FAO species catalogue. Vol.4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of sharks species known to date. Part. 1 and Part. 2. FAO Fish. Synop.*, v.4, 655 p., 1984.

Conrath, C.L. & Musick, J.A. Reproductive biology of the dusky smooth-hound, *Mustelus canis* in the northwest Atlantic Ocean. *Env. Biol. Fish.*, n. 64: 367-377, 2002.

- Conrath, C.L. Reproductive biology, p. 103-126, in Musick, J.A. & Bonfil, R. (eds.), *Management techniques for elasmobranch fisheries*. FAO Fisheries Technical Paper, n. 474. Rome, <http://www.fao.org/agris>, 2005
- Dubois, W. & Callard, G.V. Shark testis model: Stage-dependent functions and the regulation of spermatogenesis. *J. Exper. Zool.*, v. 256, p. 142-144, 2005.
- DuBuit, M.H. Age et croissance de *Raja batis* set de *Raja naevus* em Mer Celtique. *J. Cons. int. Explor. Mer.* v.37, n. 3, p. 261-265, 1976.
- Gallagher, M.J. *The fisheries biology of commercial ray species from two geographically distinct regions*. Ph.D. Thesis, Department of Zoology, University of Dublin, Trinity College, Dublin, 2000.
- Girard, M.; Rivalan, P. & Sinquin, G. Testis and sperm morphology in two deep-water squaloid sharks, *Centroscymnus coelepis* and *Centrophorus squamosus*. *J. Fish Biol.*, v. 57, n.6, p.1575-1589, 2000.
- Grotenberg, L. & Vooren, C. M. Age and growth of the blue shark *Prionace glauca*, from southern Brasil. In *Projeto ARGO, Relatório final, v.2. Avaliação dos recursos pesqueiros dos peixes pelágicos de grande porte, parte 3*. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 1999.
- Guedes, V.; Kotas, J.E. & Santos, S. *A pesca de espinhel de superfície ("longline") na região sudeste-sul do Brasil*. Relatório anual técnico-científico. Programa Revizee/Score-Sul, Itajaí, 183 p. 1999.
- Hara, M. & Tanaka, S. An overview of Chondrichthyan seminiferous follicles using electron microscopy, p. 131-142, in Pratt, Jr., H.L.; Gruber, S.H. & Taniuchi, T. (eds.), *Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries*. NOAA Technical Report NMFS 90, 518 p. 1990.
- Hazin, F. H. V. *Ecology of the blue shark, Prionace glauca, in the southwestern equatorial Atlantic Ocean*. M.Sc. Dissertation. Tokyo University of Fisheries, Department of Marine Science and Technology, Laboratory of Fisheries Oceanography, 163p. Tokyo, 1991.
- Hazin, F.H.V. *Fisheries-oceanographical study on tunas, billfishes and sharks in the southwestern Equatorial Atlantic ocean*. Ph.D. Thesis. Graduate School of Fisheries, Tokyo University of Fisheries, 286 p. Tokyo, 1993.
- Hazin, F.H.V.; Kihara, K.; Otsuka, K.; Boeckman, C.E. & Leal, E.C. Reproduction of the blue shark *Prionace glauca* in the southwestern Equatorial Atlantic ocean. *Fish. Sci.*, v. 60, n.5, p. 487-491, 1994.
- Hazin, F.H.V. & Pinheiro, P.B. Biologia reprodutiva do tubarão azul, *Prionace glauca* (Elasmobranchii Carcharhiniformes), no Atlântico Sudoeste Equatorial. In: *Anais do VII Congresso Nordestino de Ecologia - I Reunião da Sociedade Brasileira para o Estudo dos Elasmobrânquios (SBEEL)*, Ilhéus, 1997.
- Hazin, F.H.V.; Pinheiro, P.B. & Broadhurst, M.K. Further notes on reproduction of the blue shark, *Prionace glauca*, and a postulated migratory pattern in the South Atlantic Ocean. *Ciência e Cultura*, v.52, n.2, p. 114-120, 2000.
- Heuper, M.R.; Whittier, J.M. & Bennett, M.B. Plasma steroid hormone profiles and reproductive biology of the epaulette shark, *Hemiscyllium ocellatum*. *J. Exper. Zool.*, n.284, p. 586-594. 1999.
- Joung, S.J. & Chen C.T. Reproduction in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, in the waters off north-eastern Taiwan. *Copeia*, p. 659-665, 1995.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. *Histologia básica*. Guanabara Koogan . 426 p., Rio de Janeiro, 2004.
- Kohler, N.E.; Turner, P.A.; Hoey, J.J.; Natanson, L.J. & Briggs, R. Tag and recapture data for three pelagic shark species: blue shark (*Prionace glauca*), shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*), and porbeagle (*Lamna nasus*) in the north Atlantic ocean. *Col.Vol.Sci.Pap. IC-CAT*, v. 54, n.4, p. 1231-1260. 2002.
- Legat, J.F.A. *Distribuição, abundância, reprodução e morfometria de Prionace glauca no sul do Brasil*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 118 p., Rio Grande, 2001.
- Legat, J.F.A. & Vooren, C.M. Reproductive cycle and migration of the blue shark (*Prionace glauca*) in South Atlantic Ocean. <http://www-heb.pac.dfompo.qqca/congress/2004/comm./06legatreprod.doc>. 2004.
- Manire, C.A. & Rarmussen, L.E.L. Serum concentrations of steroid hormones in the mature male bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*. *Gen. Comp. Endocrinol.* n.107, p.414-420, 1997.
- Maruska, K.P., Cowie, E.G. & Tricas, T.C. Periodic gonadal activity and protracted mating in elasmobranch fishes. *J. Exp. Zool.*, n. 276, p. 219-232, 1996.
- McEachran, J.D. Egg capsules and reproductive biology of the skate *Raja garmani* (Pisces: Rajidae). *Copeia*, n.1976, p.197-199, 1970 .
- Megalofonou, P.; Damalas, D. & De Metrio, G. Size and sexual maturity of the blue shark, *Prionace glauca*, in the Mediterranean sea. *Commission of the European Communities* (Project No 97/50 DG XIV/C1), n. 09. 2005
- Myers, R.A. & Worm, B. Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature*, v. 423. www.nature.com/nature, 2003

- Nolan, C.P.; Gallagher, M.J.; Foley, D.; Deane, J. & Jeal, F. Gonadal maturity in rajids. *NAFO SCR Doc.* 02/131. Serial n.4753, 5 p., 2002.
- Parsons, G.R. The reproductive biology of Atlantic sharpnose shark *Rhizoprionodon terraenovae* (Richardson). *Fish. Bull.* v. 81, p.61-73. 1983
- Parson, G.R. & Grier, H.J. Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. *J. Exper. Zool.*, v. 261, p. 173 -184, 1992
- Pratt, H. L. Reproduction in the blue shark *Prionace glauca*. *Fish. Bull.*, v. 77, n. 2, p. 445-470, 1979.
- Richards, S.W., Merriman, D. & C.H. Calhoun. Studies on the marine resources of southern New England. IX. The biology of the little skate *Raja erinacea* Mitchell. *B. Bingham Oceanogr. Comm.*, v.18, p.1-67, 1963.
- Stehmann, M. Quick and dirty tabulation of stomach contents and maturity stages for skates (Rajidae), squaloid and other ovoviviparous species of sharks. *Am. Elasm. Soc. Newsletter*, v. 3, 1987
- Ross, M.H.; Reith, E.J. & Romrell, L.J. *Histologia: texto e atlas*. Panamericana, 779 p., São Paulo, 1993.
- Schwingel, P.R. & Mazzoleni, R.C. Aspectos da biologia das espécies capturadas por espinhel pelágico na costa sul do Brasil no inverno de 2001. *Notas Técnicas da FACIMAR*, Itajaí, n.8, p.75-82, 2004.
- Wourms, J.P. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *Amer. Zool.*, n. 17, p. 379-410. 1977.