

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

PRICILA VIANA DE OLIVEIRA

**CICLO TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE DE *Devario
aequipinnatus* (CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE) SUBMETIDO A
DIFERENTES TEMPERATURAS.**

Ilha Solteira
2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA ANIMAL

PRICILA VIANA DE OLIVEIRA

**CICLO TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE DE *Devario aequipinnatus*
(CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE) SUBMETIDO A DIFERENTES
TEMPERATURAS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Câmpus de Ilha Solteira como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Prof^ª. Dr^ª. Rosicleire Veríssimo Silveira
Orientadora

Ilha Solteira
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Oliveira, Pricila Viana de.
O482c Ciclo testicular e espermatogênese de *Devario aequipinnatus* (cypriniformes, cyprinidae) submetido a diferentes temperaturas / Pricila Viana de Oliveira. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2016
77 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Ciência e Tecnologia Animal, 2016

Orientador: Rosicleire Veríssimo Silveira
Inclui bibliografia

1. Ciprinídeo. 2. Espermatogônia. 3. Reprodução. 4. Temperatura.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Ciclo testicular e espermatogênese de *Devario aequipinnatus* (Cypriniforme, Cyprinidae) submetido a diferentes temperaturas..

AUTORA: PRICILA VIANA DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Prof. Dr. IGOR PAIVA RAMOS
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP


Prof. Dr. DIÓGENES HENRIQUE DE SIQUEIRA SILVA
Universidade de São Paulo

Ilha Solteira, 03 de março de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Pricila Viana de Oliveira – nascida em 21 de janeiro de 1991, na cidade de Ilha Solteira/SP – Brasil, filha de Marta Aparecida Viana de Oliveira e Paulo Xavier de Oliveira. Em dezembro de 2013, concluiu a graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho - Unesp – Faculdade de Engenharia *Campus* de Ilha Solteira, Brasil.

Em março de 2014, iniciou o curso de Pós-Graduação no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, na área “Tecnologia na produção de não ruminantes”, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa Interunidades do *Campus* Experimental de Dracena e *Campus* de Ilha Solteira, realizando estudos na área de “Reprodução de Peixes”.

“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez”

Jean Cocteau

“...Seja forte e corajoso! Não tenha medo, nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1.9 – Bíblia Sagrada

DEDICATÓRIA

*Aos meus grandes amores, papai Paulo, mamãe
Marta e irmão Paulo Victor; a quem devo tudo o que me
tornei e com quem aprendi o que realmente é
perseverança; a aqueles que nunca me deixaram
desistir, mesmo sem dizer uma palavra, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Como poderia te agradecer Deus, por tudo o que fizeste por mim? Mais uma vez o Senhor mostrou que não é uma nuvem, ou um vento, ou apenas uma força, o Senhor é mais... é Pai. Cuidou de mim nos mínimos detalhes, com o cuidado de um Pai que ama. Obrigada por ter me dado forças, quando chegava no meu limite, obrigada pelas lágrimas que derramei, porque sem dúvida sou melhor hoje devido a elas. Obrigada pelas alegrias, que me trouxeram esperança. Pela sabedoria e entendimento, pela oportunidade de realizar esse trabalho, que o Senhor, mais do que ninguém sabe, não é apenas um trabalho, mas sim um sonho. Por isso te devolvo como oferta de gratidão.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista – Júlio Mesquita Filho – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS, pela oportunidade do estudo.

Agradeço a Prof^a Dr^a Rosicleire Veríssimo Silveira, minha orientadora, mãe, psicóloga, amiga, conselheira e muito mais. Obrigada por todas os conselhos, por todas as reuniões, todas as broncas, elogios, jantares, brincadeiras e choros, pelas lembrancinhas de viagens, por todo o empenho em me ajudar sempre. Tudo isso me fez entender exatamente como proceder para manter uma relação profissional de respeito, e uma amizade e carinho que faz com que os alunos saibam que não são simples alunos de um laboratório, são parte da vida. Quando crescer quero ser como a senhora!! Do mesmo modo, agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira, que esteve presente em todos os momentos, auxiliando em tudo, sempre com os conselhos mais pertinentes. Obrigada pelo carinho, atenção e respeito sempre dedicado. Não posso deixar de agradecer a Gabriela, nossa irmãzinha. Quantas vezes a privamos de momentos em família devido as intermináveis correções de trabalhos e afins. Gabi, obrigada pelo carinho e respeito sempre dedicado a nós.

Agradeço aos membros da banca examinadora da Qualificação, Dr. Diógenes Henrique Siqueira Silva, Prof^a Dr^a Cristiéle Ribeiro e Prof. Dr. Edson Guilherme Vieira, por terem aceitado o convite, agradeço pelas correções e conselhos. Também à banca examinadora da dissertação Prof^a Dr^a Cristiéle Ribeiro, Dr. Diógenes Henrique Siqueira Silva e Prof. Dr. Igor Paiva Ramos pela colaboração e pronto atendimento ao convite.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Ictiologia Neotropical – L.I.NEO, pelas colaborações, conselhos e bons momentos vividos; em especial a Laíza, no qual me auxiliou na montagem e execução do experimento, e ao Raphael Costa, no auxílio em tudo, em especial nas análises estatísticas desse trabalho.

Agradeço aos funcionários da Universidade, Wilder, pelo auxílio na montagem do sistema e manutenção dos equipamentos; A Meire e Dona Cleusa pela colaboração em tudo.

Agradeço ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal, na pessoa da coordenadora, Prof^a Dr^a Rosimeire Filardi, que não mediu esforços para nos ajudar no que fosse necessário.

Agradecimento mais que especiais

Agradeço aos meus pais, Paulo Xavier de Oliveira e Marta Viana de Oliveira pelo empenho em me ajudar, pela força, pelas orações. Pela educação que me deram, pelas correções e broncas, pelos conselhos, pelos ensinamentos de acordo com a Palavra de Deus. Embora não tenham cursado uma Universidade, com os senhores aprendi o que tenho de mais valioso. Aprendi sobre caráter, sobre como tratar as pessoas, como lutar, como ser perseverante. Aprendi a orar e o poder da oração, aprendi sobre o tempo e que nem tudo ocorre do jeito que queremos, mas que “todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus”. Se eu escrevesse aqui todos os motivos que tenho para agradecer, e o quanto eu os amo, seriam muito mais páginas do que o próprio trabalho. Amo vocês!

Agradeço ao meu pequeno, que não é mais tão pequeno, meu irmão Paulo Victor Viana de Oliveira, pela força e orações. Por me estimular a cada dia a lutar e vencer, por me lembrar que eu tenho por quem batalhar. Amo você!

Ahh... minhas amigas!! Agradeço a Deus por me permitir dividir tantos momentos com vocês. Agradeço pela paciência, pelo amor e carinho mesmo na ausência. Pelas palavras de incentivo, pelas orações e pelos momentos bons que passamos. Andreza e Carol obrigada por serem quem são para mim, por fazerem o que fazem. Eu amo vocês, minhas irmãs!!!!

Agradeço a minha família, avós, tios, primos, e afins, por respeitarem minha ausência, mas não deixaram de me amar, nem mesmo de orar por mim.

Agradeço a minha segunda família, a Maria Francisca, Sebastião e a minha pequena em tamanho, mas não em coração grande amiga Lorrainy. Obrigada por todos os momentos bons e ruins que compartilhamos, pelo carinho e orações.

Agradeço ao Roger, que foi um presente de Deus. Em meio a tanta dor e solidão Deus me deu você, para me amar e cuidar de mim. Obrigada por toda a colaboração, toda a paciência, pelas orações, pelo incentivo. Por cada abraço de consolo, pelos sonhos e planos que me fazem ter esperança.

Agradeço a minha nova família, a Dona Gel, a Ana Paula e Leonardo Keoma, por todo o suporte físico, afetivo e espiritual. Pelos abraços quando Andradina parecia mais longe do

que o normal. Paula, agradeço por você ter escolhido me amar, por ter sido minha amiga, mãe, e coincidentemente minha cunhada, obrigada pelas lágrimas que derramamos juntas e pelos sorrisos, amo você. Agradeço também ao Marcelo e ao Felipe, pelo carinho.

Agradeço a Igreja Apostólica Fonte da Vida e toda a família Dokmos pelo apoio, provisão, orações. Pelos momentos de lazer e de trabalho. Obrigada por tudo.

A todos os que torcem por mim, a todos que de alguma forma cooperaram para que esse trabalho fosse realizado, eu agradeço de coração.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

RESUMO.....	10
ABSTRACT	12
1. REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1. REPRODUÇÃO	15
1.2. MORFOLOGIA TESTICULAR	16
1.3. ESPÉCIE MODELO	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2 - CICLO TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE DE <i>Devario aequipinnatus</i> (CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE) SUBMETIDO A DIFERENTES TEMPERATURAS.	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	30
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
3.3. COLETAS	31
3.4. PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	31
3.5. ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO	31
3.6. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA	32
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1. ESTRUTURA TESTICULAR DE <i>D. aequipinnatus</i>	33
4.2. ESPERMATOGÊNESE EM <i>D. aequipinnatus</i>	34
4.3. Fase Espermatogonial.....	34
4.4. Fase Espermatocitária.....	35
4.4.1. Espermiogênese.....	36
4.5. CICLO TESTICULAR EM <i>D. aequipinnatus</i>	43

3.1.1. Maturação Intermediária	43
1.1.2. Maturação Final 1	43
1.1.3. Maturação Final 2	43
1.1.4. Maturação Final 3	44
1.1.5. Maturação Final 4	44
1.1.6. Regressão	44
4.6. EFEITO DAS TEMPERATURAS NO CICLO TESTICULAR	51
4.6.1. Temperatura de 24 ° C	51
4.6.2. Temperatura de 18 ° C	51
4.6.3. Temperatura de 30 ° C	52
4.7. ANÁLISE DO IGS	60
4.8. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA	61
4.8.1. Células Picnóticas	61
4.8.2. Espermatogônias	62
4.8.3. Espermatócitos	63
4.8.4. Espermatozoides	64
4.8.5. Células de Sertoli	65
4.8.6. Lúmen	66
4.8.7. Interstício	67
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

RESUMO

A influência antrópica vem crescendo continuamente no ambiente, legitimando a importância de se investigar as causas de estresse aos animais nos sistemas naturais no qual se encontram. Como resultados a essas ações houve um aquecimento linear de 0,85 °C nas últimas décadas e, estudos demonstram que essa temperatura pode aumentar em 4,8 °C até 2100. A compreensão da atuação da temperatura sobre os animais aquáticos contribui significativamente para as previsões dos efeitos na população e níveis de comunidades, já que poucos fatores ambientais têm maior influência sobre a atividade animal do que a temperatura, devido a exposição física externa. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de diferentes temperaturas sobre o ciclo testicular e a espermatogênese de *D. aequipinnatus*. Para o presente estudo foram utilizados exemplares machos de *D. aequipinnatus*. Foram testadas três temperaturas 18°, 24° e 30° e utilizados 20 exemplares para cada temperatura. As coletas foram realizadas em um intervalo de 4 dias, totalizando 10 coletas, onde cinco indivíduos de cada tratamento foram coletados. Após aferidos dados biométricos os testículos foram submetidos a procedimentos usuais de histologia. As lâminas obtidas foram analisadas sob microscopia de luz. Para a análise estereológica, utilizou-se um grid de intersecção de 475 pontos (Motic Image Plus 2.0), sobreposto a uma área da secção histológica; foram contados os seguintes componentes: espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, espermatozoides, células de Sertoli, células com núcleo picnótico, interstício e lúmen. Para análise estatística, aplicou-se o teste de homogeneidade de Bartlett e o teste de normalidade de Shapiro Wilk. Quando atenderam as premissas, aplicou-se ANOVA e teste de Tukey ($P < 0.05$), quando não, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis. As fases de maturação gonadal encontradas foram maturação intermediária, maturação final - dividida em maturação final 1, maturação final 2, maturação final 3 e maturação final 4 – e regressão (somente em 18°), que apresenta características de reabsorção e proliferação celular ocorrendo na mesma fase. Os maiores valores de IGS ocorreram em indivíduos em maturação final 1. A temperatura de 30° acelerou a espermatogênese, e 18 °C proporcionou período reprodutivo mais longo; porém na temperatura de 30 °C houveram danos a morfologia testicular, causando uma desorganização gonadal e a supressão da espermatogênese nas regiões lesadas. Em 18 °C houve a formação de vacúolos no citoplasma e núcleo das de espermatogônias e espermatócitos. Além disso, o número de células picnóticas foi maior em 18 °C e 30 °C, em

relação ao controle. Indivíduos mantidos a 30° apresentaram maior número de espermatogônias.

Palavras Chave: Ciprinídeo. Espermatogônia. Reprodução. Temperatura.

ABSTRACT

The human influence has been growing continuously in the environment, legitimizing the importance of investigating the causes of stress to animals in natural systems in which they are. As a result of these actions there was a linear heating of 0.85 ° C in recent decades, and studies show that this temperature could increase in 4.8 ° C until 2100. Understanding the temperature acting on aquatic animals contributes significantly to the predictions of the effects on population and levels of communities, as few environmental factors have the greatest influence on animal activity than the temperature due to external physical exposure. The aim of this study was to investigate the influence of different temperatures on testicular cycle and spermatogenesis of *D. aequipinnatus*. For this study were used copies males *D. aequipinnatus*. Three temperatures were tested 18 °C, 24 °C and 30 °C, and used 20 specimens for each temperature. Samples were collected in a four-day intervals, totaling 10 collections, in which five individuals from each treatment were collected. After measured biometric data testes underwent usual histology procedures. The obtained slides were examined under light microscopy. For stereological analysis, we used a 475 grid intersection points (Motic Image Plus 2.0) overlapping an area of the histological section; were counted the following components: spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa, Sertoli cells, cells with pyknotic nucleus, interstitium and lumen. Statistical analysis was applied Bartlett's homogeneity test and the Shapiro-Wilk normality test. When met the assumptions applied ANOVA and Tukey test ($P < 0.05$), if not, we applied the Kruskal Wallis test. It was found of intermediate maturation, final maturation - divided into: final maturation 1, final maturing 2, final maturation 3 and final maturation 4 - and regression (only 18°C) having cell resorption and proliferation characteristics occurring in the same phase. The highest GSI values occurred in individuals in final maturation 1. Temperature of 30 °C accelerated spermatogenesis, and 18 ° C provided a longer reproductive period; but at the temperature of 30 ° C there were damage to testicular morphology, causing gonadal disruption and suppression of spermatogenesis in the damaged regions. At 18 ° C was the vacuole formation in the cytoplasm and nucleus of spermatogonia and spermatocytes. Furthermore, the number of cells was higher in picnotic 18 ° C and 30 ° C, compared to the control. Animals kept at 30 °C showed greater number of spermatogonia.

Keywords: Cyprinid. Spermatogonia. Reproduction. Temperature.

1. REVISÃO DE LITERATURA

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças do Clima (IPCC), criado pela Organização das Nações Unidas, no âmbito da Organização Meteorológica Mundial (OMM) divulgou em 2013 um relatório completo com dados estimados e perspectivas acerca da temperatura global, demonstrando um aumento de temperatura desde o final do século 19, bem como a informação de que as três últimas décadas têm sido, sucessivamente, as mais quentes, comparadas as décadas anteriores, sendo a primeira década do presente século considerada a mais quente desde o início das medições.

O IPCC (2013), estima uma tendência linear de aquecimento de 0,85 °C durante o período de 1880 a 2002. Em relação ao futuro, o Painel analisou quatro cenários possíveis até 2100. No caso do cenário mais otimista, o aumento da temperatura pode variar entre 0,3 °C e 1,7 °C. Já a hipótese mais pessimista afirma um aumento entre 2,6 °C e 4,8 °C.

As considerações para o relatório do IPCC foram feitas de acordo com o aumento de temperatura registrado e da emissão de gases que provocam o efeito estufa no período de 1986 a 2005. Dessa forma, o Painel considera “extremamente provável” que a atividade humana seja a principal causa dessas mudanças, com estimativas de certeza de 95%, reforçando os dados do relatório de 2007, que classificava como “muito provável” (90%) a responsabilidade humana (IPCC 2013, 2014).

O aumento da densidade populacional e urbanização, desenvolvimento da economia, mudanças geomorfológicas, assim como a gestão dos recursos aquícolas, desafiam a sustentabilidade dos recursos por diminuírem o abastecimento de água, devido ao aumento da demanda da mesma (IPCC, 2014).

A frente destas mudanças, o ciclo hidrológico também vem sofrendo alterações. Segundo os dados do Canal Clima, Unesp (2015) na estação de Ilha Solteira, no ano de 2014, houveram 61 dias de seca extrema, com média anual de precipitação de 110,4 mm, bem aquém de 2008, quando esta chegou a 143,8 mm. Em relação as médias anuais de temperatura foram 24,4 °C em 2008 e 25,4 °C em 2014, assim, o último ano foi mais seco e mais quente.

As mudanças no ciclo hidrológico e alterações na temperatura terrestre causam impactos negativos nos ambientes, causando alterações sobre a distribuição e abundância das espécies aquáticas (PAUL; FARUQUE; AHSAN, 2014), isso porque quase todas as alterações no ambiente de uma espécie, seja natural ou induzida, por fatores bióticos ou abióticos, geram uma pressão de seleção (GIENAPP et al., 2008).

Frente as novas pressões de seleção, as populações podem responder de três formas. A primeira forma é a fuga para outros lugares mais favoráveis; segundo, permanece no ambiente e se ajusta às novas condições, por meio de ajustes morfológicos, fisiológicos e outros, sem alterar sua constituição genética. E por fim, eles podem se adaptar às novas condições por meio de ajustes evolutivos da constituição genética (HOLT, 1990 citado por GIENAPP et al., 2008).

A temperatura é um fator que afeta diretamente alguns aspectos limnológicos, como disponibilidade de oxigênio, pH, salinidade e turbidez (CAMPANA, et al., 1996; BOUEF, BAIL, 1999; BALDISSEROTTO, 2009); e segundo Randall, Burggren e French (2008), poucos fatores ambientais têm maior influência sobre a atividade animal do que a temperatura. No caso dos peixes essa influência é ainda maior, já que o desenvolvimento embrionário e larval ocorre em plena exposição física externa, onde grandes alterações podem ocorrer (ITO et al., 2008). Além disso, os peixes são animais pecilotérmicos, cujas temperaturas corporais flutuam de acordo com o ambiente (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Dessa maneira, a velocidade das reações e atividade enzimática, são totalmente influenciadas pela temperatura. Sob aquecimento da água, há o aumento do metabolismo, assim, o aumento da frequência cardíaca, da ventilação branquial e do consumo de oxigênio, o que gera maior gasto energético (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2008; BALDISSEROTTO, 2009).

Embora os peixes tenham evoluído faixas de tolerância de temperatura específicas, denominada de zona de conforto (KUBITZA, 2000) para permitir o desenvolvimento de embriões viáveis e manutenção da sua homeostase (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2008), mudanças na temperatura do ambiente podem agir como agentes estressores agudos em peixes (LIMA et al., 2007; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009), influenciando o perfil da resposta, como aumento nos níveis de cortisol, culminando em efeitos adversos no desempenho reprodutivo dos peixes por meio de alterações na fecundidade, tamanho dos ovos e desenvolvimento larval (LIMA et al., 2007), na diferenciação sexual (STRÜSSMANN; SAITO; TAKASHIMA, 1998), bem como na supressão da espermatogênese (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015).

A temperatura pode exercer ação direta na gametogênese, na secreção das gonadotrofinas, na eliminação metabólica de hormônios, na resposta à ação de estrógenos sobre a produção de vitelogenina pelo fígado e na resposta das gônadas à estimulação hormonal (BALDISSEROTTO, 2009). De acordo com Devlin e Nagahama (2002) a

determinação do sexo dos peixes pode ser controlada pela temperatura, como observado em pelo menos oito famílias de peixes com mandíbulas e uma espécie de Agnata.

Desse modo, o crescimento continuado da ação antrópica e suas consequências comprovam a importância de se investigar as influências dessas ações aos animais nos sistemas naturais no qual se encontram (WIKELSKI; COOKE, 2006).

1.1 REPRODUÇÃO

Frente a amplitude de habitats dentro do ambiente aquático e as alterações que os peixes podem sofrer no meio em que vivem, os teleósteos alcançaram sucesso em ambientes distintos por apresentarem várias estratégias reprodutivas, que englobam táticas extremas. As estratégias reprodutivas permitiram adaptações ambientais tanto para as condições bióticas (predação, disponibilidade de alimento) como abióticas (temperatura, fotoperíodo, oxigênio disponível etc.) (VAZZOLER, 1996.).

Nos teleósteos, a gametogênese é um processo altamente complexo, modulado pelas variações ambientais e fisiológicas (COWARD; BROMAGE, 2000). A base celular da reprodução sexual em animais são as células germinativas haploides; as fêmeas produzem um número relativamente baixo de grandes células, os oócitos, que são ricos em reservas e os machos produzem um número alto de células pequenas, os espermatozoides (SCHULZ et al., 2010). A fonte dessas células responsáveis pela reprodução é o epitélio germinativo (GRIER, 1993).

O epitélio germinativo se assemelha aos demais epitélios pelas características que os definem, porém difere pela presença das células germinativas, precursoras dos oócitos e espermatozoides, além de células somáticas (GRIER, 2002).

A espermatogênese é um processo cíclico e especializado, que ocorre por meio da autorrenovação e diferenciação das células tronco espermatogoniais, onipotentes, isto é, responsáveis por uma única linhagem de células, as germinativas, que após diferenciação darão origem a outras células germinativas comprometidas com a formação de espermatozoides (HOFMANN; BRAYDICH-STOLLEA; DYM, 2005; SCHULZ et al., 2010, SIQUEIRA-SILVA et al., 2015). O processo da espermatogênese é semelhante na maioria dos vertebrados (QUAGIO-GRASSIOTTO; OLIVEIRA, 2008; BILLARD, 1986).

Em três fases principais pode ser dividida a espermatogênese: 1) proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias tronco se dividem por meio de rápidas e

sucessivas divisões mitóticas e originam espermatogônias secundárias ou do tipo B que, depois de um número de divisões mitóticas - que varia de espécie para espécie-, diferenciam-se em espermatócitos primários; 2) a fase meiótica ou espermatocitária, na qual o material genético é duplicado, recombinado e segregado, originando as espermatídes haploides; e 3) fase da diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermatídes passam por drásticas mudanças morfológicas e fisiológicas para formação do espermatozoide (BILLARD, 1986; NOBREGA et al., 2010; VERISSIMO-SILVEIRA et al., 2006; SCHULZ et al., 2010).

1.2. MORFOLOGIA TESTICULAR

Em todos os vertebrados, o testículo é composto por dois compartimentos principais, o intertubular (ou intersticial) e do compartimento tubular. O compartimento intertubular contém células esteroideogênicas de Leydig, vasos sanguíneos e linfático, macrófagos, mastócitos, e tecido neural e conjuntivo (KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002).

O compartimento intertubular é delimitado por uma membrana basal, onde apoia-se o epitélio germinativo, e o separa do tecido conjuntivo subjacente. O epitélio germinativo preenche as características de um epitélio, exceto pela especialidade em possuir dois tipos de células: células somáticas e células germinativas nos diferentes estágios, envolvidas na produção espermática (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes) (GRIER, 1993; GRIER, 2000; GRIER, 2002; GRIER; ARANZABAL, 2009; PARENTI; GRIER, 2004, SCHULZ et al., 2010).

No ciclo reprodutivo anual de machos de peixes, as classes reprodutivas podem ser definidas devido a mudanças no epitélio germinativo e os estágios das células germinativas que estão presentes. Essas mudanças são facilmente percebidas histologicamente, elas são baseadas se há continuidade ou descontinuidade no epitélio germinativo (BROWN-PETERSON; GRIER; OVERSTREET, 2002; GRIER; TAYLOR, 1998; GRIER 2002; GRIER; ARANZABAL, 2009; SIQUEIRA-SILVA et al. 2013)

O epitélio contínuo é constituído por uma população contínua de células de Sertoli e de células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes), ao longo do túbulo seminífero. Já o epitélio germinativo descontínuo, é caracterizado pela perda gradual de células germinativas do epitélio, devido a liberação dos espermatozoides (espermiacção). Como esse evento não ocorre uniformemente, alterna-se um epitélio formado apenas por células de Sertoli, e regiões com epitélio germinativo típico, contendo células germinativas

associadas a células de Sertoli, constituindo a descontinuidade do epitélio (GRIER, TAYLOR, 1998; GRIER 2002; GRIER; ARANZABAL, 2009).

Com base na morfologia testicular, os testículos podem ser classificados em lobular e tubular anastomosado. O testículo lobular é caracterizado pela presença de um epitélio germinativo confinado em compartimentos, que terminam na periferia de gônada em fundo cego. Já o tipo tubular anastomosado possui o epitélio germinativo altamente interconectados, formando ramificações que não apresentam região de início ou término (GRIER et al, 1980; GRIER, 1993; PARENTI; GRIER, 2004).

Testículos do tipo lobular, são característicos de Neoteleósteos, filogeneticamente mais derivados (PARENTI; GRIER, 2004; GRIER; ARANZABAL, 2009) como, *Rachycentron canadum*, (BROWN-PETERSON; GRIER; OVERSTREET, 2002), *Cichla kelberi* (SIQUEIRA-SILVA et al., 2013), *Esox lucius* e *E. niger* (GRIER, 1981) e muitas outras espécies pertencentes a diferentes ordens (PARENTI; GRIER, 2004). Já os testículos do tipo tubular anastomosado, são encontrados em teleósteos filogeneticamente mais basais, como espécies da ordem Cypriniformes (*Notemigonus crysoleucas*, *Notropis hypselopterus*) (PARENTI; GRIER, 2004; GRIER; ARANZABAL, 2009).

Em relação a distribuição das espermatogônias primárias ao longo do compartimento germinativo, há três padrões de distribuição dessas células. O primeiro tipo, denominado espermatogonial restrito, caracteriza-se pela restrição das espermatogônias primárias a porção distal dos lóbulos, e ocorre em Atheriniformes, Cyprinodontiformes e Beloniformes (PARENTI; GRIER, 2004). O segundo, é o tipo espermatogonial irrestrito, descrito em Salmoniformes, Cypriniformes, Characiformes entre outros (GRIER, 1980; PARENTI; GRIER, 2004, VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003), no qual as espermatogônias primárias estão distribuídas ao longo de todo o comprimento do epitélio germinativo. O terceiro tipo, é considerado um “intermediário” aos dois supra citados, (SCHULZ et al., 2010), visto que as espermatogônias indiferenciadas localizam-se preferencialmente próxima a túnica albugínea, porém podem ser encontradas ao longo do epitélio. Esse padrão de distribuição espermatogonial foi encontrada por Siqueira-Silva et al, (2013) no tucunaré amarelo, *C. kelberi*.

Nos Anamniotas (peixes e anfíbios) a espermatogênese se desenvolve no interior de unidades funcionais, chamadas cistos ou espermatocistos, formados por um dinâmico grupo de células de Sertoli que envolve e nutre células germinativas, com desenvolvimento sincrônico. Este sincronismo entre as células germinativas de um mesmo cisto é resultado de citocineses incompletas, sofridas durante as primeiras divisões mitóticas das espermatogônias

primárias, que se mantêm interconectadas por pontes citoplasmáticas (GRIER, 1980; SCHULZ et al., 2010). A duração do processo de espermatogênese em peixes é menor do que nos mamíferos, e é influenciada pela temperatura da água (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009).

1.3. ESPÉCIE MODELO

A espécie escolhida para a realização do presente estudo, *Devario aequipinnatus*, pertence a Ordem Cypriniformes. Esta ordem reúne diversas espécies de peixes de água doce que estão distribuídos na América do Norte, África e Eurásia (MAYDEN et al. 2007), com maior diversidade de exemplares no sudeste da Ásia. Estão ausentes na Austrália e na América do Sul. Eles são popularmente conhecidos como peixes de aquário, especialmente os “minnows” e “loaches” (NELSON, 2006).

Pertencente à ordem Cypriniformes, muitos membros da família Cyprinidae são espécies importantes na aquariofilia, sendo muito coloridos e com enorme potencial ornamental, como o “goldfish” (*Carassius auratus*) (FANG; KULLANDER, 2009). Alguns representantes desta família também apresentam grande importância econômica, como a carpa, *Cyprinus carpio*, no qual ocupa a terceira posição no ranking das espécies mais produzidas no Brasil, contribuindo com 38.079,1 toneladas no ano de 2011 (BRASIL, 2013; FAO, 2011; 2014).

Outras espécies desta família têm sido amplamente utilizadas em pesquisas científicas. Este é o caso do *Danio rerio*, conhecido como “Danio” ou “zebrafish”, utilizado como modelo biológico em muitas pesquisas científicas (COSSINS; CRAWFORD, 2005), tais como desenvolvimento e condições ambientais (LAWRENCE, 2007) desenvolvimento embrionário e genética (COSSINS; CRAWFORD, 2005; NELSON, 2006), pesquisas de toxicologia e transgenia (LELE; KRONE, 1996), estudos sobre a organização celular dos testículos, espermatogênese e gerações espermatogoniais (LEAL et al., 2009; RUPIK; HUSZNO; KLAG, 2011), e supressão da espermatogênese e transplante de células tronco espermatogoniais (NÓBREGA et al., 2010). Pertencente à família Cyprinidae, *Devario aequipinnatus*, também conhecido popularmente como “Danios” é a espécie estudo deste trabalho.

Devario aequipinnatus foi descrito originalmente no ano de 1839 por Mclelland (1839), sendo denominado como *Perilampus aequipinnatus*. Somente em 1981 foi transferida

para o gênero *Danio*, onde permaneceu até o ano de 2003, quando Fang (2003) por meio de uma pesquisa filogenética encontrou maiores semelhanças com os indivíduos do gênero *Devario*.

Segundo Lele e Krone (1996), os “Danios” possuem inúmeras vantagens para serem utilizados em pesquisas laboratoriais, tais como, o baixo custo de manutenção, baixa exigência de espaço. Iniciam a maturação gonadal cedo, com aproximadamente 20 milímetros e possuem rápido ciclo reprodutivo.

Essas facilidades de manejo no laboratório fazem do *D. aequipinnatus*, um excelente modelo experimental para a investigação da influência das mudanças climáticas em peixes, além de possibilitar a aplicação de metodologias experimentais específicas, como melhoramento genético, manipulação genética, reversão sexual, esterilização e transplante celular.

Considerando o exposto, o presente trabalho teve por objetivo investigar se a temperatura exerce sobre o ciclo testicular e espermatogênese de *D. aequipinnatus*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de três temperaturas, 18 °C, 24 °C e 30 °C, no ciclo testicular e na espermatogênese de *Devario aequipinnatus*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as fases da espermatogênese de *D. aequipinnatus* com base nas alterações do epitélio germinativo e nos estágios das células germinativas encontradas no epitélio nas temperaturas testadas;
- Avaliar o índice gonadossomático nas diferentes temperaturas;
- Realizar a análise estereológica da espermatogênese nas três temperaturas.

REFERÊNCIAS

- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 2. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Jouy-en-Josas, France. **Reproduction Nutrition Développement**, Les Ulis, v. 26, n. 4, p. 877-920, 1986.
- BOUEF, G.; BAIL, P. Y. L. Does light have an influence on fish growth?. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 129-152, 1999.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Balanco 2013**. Brasília, DF, 2013. 14 p. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/Cartilha-Balan%C3%A7o-2013-Minist%C3%A9rio-Pesca-Aquicultura.pdf>> Acesso em: 12 mar. 2014.
- BROWN-PETERSON, N. J.; GRIER H. J.; OVERSTREET, R. M. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. **Journal of Fish Biology**, Chichester, p. 178-202, 2002.
- CAMPANA, S. E.; MOHN, R. K.; SMITH, S. J.; CHOUINARD, G.A. 1996. Reply: spatial implications of a temperature-based growth model for Atlantic cod (*Gadus morhua*) off the eastern coast of Canada. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 53, p. 2912-2914, 1996.
- UNESP. Área de Hidráulica e Irrigação. **Canal Clima da Unesp Ilha Solteira**. Área de hidráulica e irrigação. Ilha Solteira, 2015. Disponível em: <<http://www.clima.feis.unesp.br/>> Acesso em: 12 set. 2015.
- COSSINS, A.; CRAWFORD, D. L. Fish as models for environmental genomics. **Nature**, Washington, v. 6, p. 324- 340, 2005.
- COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. **Fish Biology and Fisheries**, London, v. 10, p. 1-25, 2000.
- DEVLIN, R.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 208, p. 191-364, 2002.

FANG, F. Phylogenetic analysis of the Asian cyprinid genus *Danio* (Teleostei, Cyprinidae). **Copeia**, Lawrence, v. 4, p. 714–728, 2003.

FANG, F.; KULLANDER, S.O. *Devario xyrops*, a new species of danionine fish from southwestern Myanmar (Teleostei: Cyprinidae). **Zootaxa**, Auckland, v. 2164, p. 33–40, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Pesca e Aquicultura**. [S. l.: s. n.], 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf>>. Acesso em 13 de mar. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Report highlights growing role of fish in feeding the world**. [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/231522/icode/>> Acesso em: 26 maio 2014.

GIENAPP, P.; TEPLITSKY, C.; ALHO, J. S.; MILLS, J. A.; MERILÄ, J. Climate change and evolution: Disentangling environmental and genetic responses. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 17, n. 1, p. 167–178, 2008.

GRIER, H.J.; LINTON, J. R.; LEATHERLAND, J. F.; VLAMING, V. L. Structural evidence for two different testicular types in Teleost fishes. **The American Journal of Anatomy**, Hoboken, v. 159, n. 3, p. 331-345, nov. 1980.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American zoologist**, Thousand Oaks, v. 21, n. 2, p. 345-357, 1981.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cells barrier. In: RUSSELL, L. D; GRISWORLD, M. D. (Ed.) **The Sertoli cell**. Clearwater: Cache River, 1993. p. 704-739.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, Chichester, v. 53, n. 3, p. 521–542, 1998.

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. **Institute of Marine Sciences**, Flórida, v. 53, p. 537-552, 2002.

GRIER, H. J.; ARANZABAL, M. C. U. The testis and spermatogenesis in teleost. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)**. Enfield: Science, 2009. v. 8. p. 119-142.

HOFMANN, M. C.; BRAYDICH-STOLLEA, L.; DYM, M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. Philadelphia. **Developmental Biology**, v. 279, p. 114– 124, 2005.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. ATMOSPHERE AND SURFACE. **Climate change: the physical science Basis**. [S. l.: s. n.], 2013. Disponível em <http://www.climatechange2013.org/images/report/WG1AR5_Chapter02_FINAL.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2015.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. FRESHWATER RESOURCES. In: **Climate change, Impacts, adaptation and vulnerability**. [S. l.: s. n.], 2014. Cap. 3, p. 4. Disponível em <http://ipcc-wg2.gov/AR5/images/uploads/WGIIAR5-Chap3_FGDall.pdf>. Acesso em: 05 jun 2015.

KOULISH, S.; KRAMER, C. R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, Leiden, v. 254, n. 3, p. 292–311, 2002.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285 p.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 269, n. 1-4, p. 1–20, 2007.

LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R., BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHLZ, R. W. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 81, p. 177-187, 2009.

LELE, Z.; KRONE, P. H., The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; LEITE, R. C.; MELO, D. C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 113–117, 2007.

MAYDEN, R. L., TANG, K. L.; CONWAY, K. W.; FREYHOF, J.; CHAMBERLAIN, S., HASKINS, M.; SCHNEIDER, L.; SUDKAMP, M.; WOOD, R. M.; AGNEW, M., BUFALINO, A., SULAIMAN, Z., MIYA, M.; SAITOH, K.; HE, S. Phylogenetic relationships of danio within the order cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. **Journal of experimental zoology**, Hoboken, v. 308B, p. 642–654, 2007.

NELSON J. S. **Fishes of the world**. Hoboken: John Wiley, 2006. 601 p.

NOBREGA, 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 Biochemical**, Chicago, v. 35, p. 197-206, 2009.

NÓBREGA R. H.; GREEBE C. D.; KANT H. V.; BOGERD J.; FRANCA L. R.; SCHULZ R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, 2010.

PARENTI, L. R.; GRIER, H. J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and comparative biology**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 333–348, 2004.

PAUL, B.; FARUQUE, M. D. H.; AHSAN, A. D. Consequences of climate change on fish biodiversity in the River Turag, Bangladesh: a community perception study. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, Dubai, v. 6, n. 2, p. 136-141, 2014.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). Philadelphia. **Zoologischer Anzeiger**, Muenchen, v. 247, p. 55–66, 2008.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações**. 4. ed. Guanabara Koogan. 2008. p. 459-462.

RUPIK, W.; HUSZNO, J.; KLAG, J. Cellular organisation of the mature testes and stages of spermiogenesis in *Danio rerio* (Cyprinidae; Teleostei)—Structural and ultrastructural studies. **Micron**, New York, v. 42, n. 8, p. 833–839, 2011.

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

SILVEIRA, U. S. DA; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. D. C. Fatores estressantes de peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, MG, v. 6, n. 4, p. 1001–1017, 2009.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; VICENTINI, C. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Reproductive cycle of the neotropical cichlid yellow peacock bass *Cichla kelberi*: a novel pattern of testicular development. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 587-596, 2013.

WIKELSKI, M; COOKE, S. J. Conservation physiology. **Trends in ecology and evolution**, Oxford, v. 21, p. 38-46, 2006.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Ed da UEM, 1996.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do Dourado (*Salminus maxillosus Valenciennes*. 1849. 60 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.**

CAPÍTULO 2 - CICLO TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE DE *Devario aequipinnatus* (CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE) SUBMETIDO A DIFERENTES TEMPERATURAS.

RESUMO

Os animais aquáticos possuem temperaturas específicas para realização de suas funções vitais, denominada zona de conforto. Porém, estes animais estão susceptíveis a alterações no ambiente que podem exercer ação direta na gametogênese. Sabendo dos efeitos nocivos, que a temperatura tem sobre a reprodução de peixes, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes temperaturas no ciclo testicular e na espermatogênese de machos de *D. aequipinnatus*. Foram avaliadas a influência de três temperaturas 18°, 24° e 30° e para cada tratamento, utilizou-se 20 exemplares de *D. aequipinnatus*. Totalizando 10, as coletas foram realizadas em um intervalo de 4 dias, no qual 5 espécimes eram anestesiados e aferidos comprimento padrão (cm), comprimento total (cm), massa do peixe (g) e massa do testículo (g). Por meio de incisão na região ventral do peixe, foi retirado os testículos e processados em técnicas usuais de histologia e analisados sob microscopia de luz. Todo o processo de coleta, fixação, microtomia, e análise foram realizados no laboratório de Ictiologia Neotropical – L.I.NEO, na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP. Para a análise estereológica, utilizou-se um grid de intersecção de 475 pontos (Motic Image Plus 2.0), sobreposto a uma área da secção histológica. Analisou-se a quantidade dos seguintes componentes: espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, espermatozoides, células de Sertoli (quando sozinhas), células com núcleo picnótico, interstício e lúmen. A análise estatística foi realizada aplicando o teste de homogeneidade de Bartlett e o teste de normalidade de Shapiro Wilk. Quando atenderam as premissas, aplicou-se ANOVA e teste de Tukey ($P < 0.05$), quando não, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis. As fases de maturação gonadal encontradas foram maturação intermediária, maturação final - dividida em maturação final 1, maturação final 2, maturação final 3 e maturação final 4 – e regressão encontrado somente em 18°. Obtivemos uma aceleração na espermatogênese em 30° e 18° verificou-se um período reprodutivo mais longo, porém ambas as temperaturas causaram danos a morfologia testicular, que se apresentaram desorganizadas e com a presença de mio-fibroblastos e, em 18°C houve a formação de vacúolos em espermatócitos e espermatogônias. O número de células picnóticas foi maior em 18° e 30°C, em relação ao controle. Sob 30° houve uma maior proliferação de espermatogônias e em 18° houve menor proliferação em relação ao controle. O IGS

encontrado em 18° e 30° foram maiores do que em 24°; os maiores IGS em 24° e 30° foram em maturação final 1, e em 18° ocorreu em maturação final 3.

Palavras Chaves: Espermatogônia. Reprodução. Temperatura. Testículo.

ABSTRACT

Aquatic animals present specific temperatures to perform their vital functions, called comfort zone. However, these animals are susceptible to changes in the environment that can act directly in gametogenesis and other factors. Knowing the harmful effects that temperature has on fish reproduction, the aim of this study was to evaluate the influence of different temperatures on testicular cycle and spermatogenesis in *D. aequipinnatus*. We evaluated the effect of three temperatures 18 °C, 24 °C and 30 °C. For each treatment, we used 20 specimens of *D. aequipinnatus*. Totaling 10, the samples were taken on a four-day break in which 5 specimens were anesthetized and had their standard length (cm), total length (cm), weight of fish (g) and weight of the testis (g) measured. Through an incision in the ventral region of the fish, the testis were removed and processed for histology using standard techniques and after analyzed by light microscopy. For stereological analysis, we used a grid of 475 intersection points (Motic Image Plus 2.0) overlapping an area of the histological section. we analyzed the amount of the following components: spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa, Sertoli cells (when alone), cells with pyknotic nucleus, interstitium and lumen. Statistical analysis was performed by applying the Bartlett homogeneity test and the Shapiro-Wilk test for normality. When comply with the assumptions, we applied ANOVA and Tukey test ($P < 0.05$), when not, we applied the Kruskal Wallis test. The following gonadal maturation phases were found: intermediate maturation, final maturation - divided into final maturation 1, final maturation 2, final maturation 3 and final maturation 4 - and regression found only in 18 °C. Individuals kept at 30 °C showed faster reproductive cycle, while 18 °C specimens had longer reproductive cycles. But both temperatures caused damage in testicular morphology, which disorganized appearance, with the presence of myo-fibroblasts and at 18 °C it was observed the formation of vacuoles in spermatocytes and spermatogonia. The number of pyknotic cells was higher in 18 °C and 30 °C, compared to the control. Under 30 °C there was a greater proliferation of spermatogonia and in 18 °C there was less proliferation than the control. The GSI found in 18 °C and 30 °C were greater than 24 °C; The larger IGS in 24 °C e 30 °C were found in final maturation 1, and in 18 °C occurred in final maturation 3.

Keywords: Spermatogonia. Reproduction. Temperature. Testes.

1. INTRODUÇÃO

A superfície global sofreu um aumento de temperatura desde o final do século 19, sendo as três últimas décadas as mais quentes, com estimativa linear de aquecimento de 0,85 °C. Estudos mostram que até 2100 esse aquecimento pode variar entre 0,3 °C e 4,8 °C (IPCC 2013). Atividades antrópicas como o aumento na emissão de gases que provocam o efeito estufa e o desmatamento têm sido apontadas como as principais causas dessas mudanças, que juntamente com o aumento populacional e de urbanização, e o desenvolvimento da economia, culminam em alterações no ciclo hidrológico (IPCC, 2013).

A disponibilidade de recursos hídricos e a temperatura tem influência diretas sobre os animais aquáticos, alterando aspectos comportamentais, padrões de distribuição e abundância de populações, podendo acarretar em migrações e extinção local da população, aspectos fisiológicos, como reações químicas e alterações no metabolismo, e aspectos reprodutivos, influenciando na secreção e respostas de hormônios relacionados a gametogênese (BALDISSEROTTO, 2009; GIENAPP et al., 2008; PAUL; FARUQUE; AHSAN, 2014; RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2008; VAZZOLER, 1996).

Os animais aquáticos apresentam faixas de temperaturas que garante sua sobrevivência, porém, existem faixas de tolerância específicas de temperatura, denominada zona de conforto, que assegura a realização das funções vitais com êxito (KUBITZA, 2000).

Porém a temperatura pode ter ação específica sobre a espermatogênese dos peixes. Nóbrega; Batlouni; França, (2009) afirmam que o processo e a duração de espermatogênese em peixes são influenciados pela temperatura da água, podendo ocorrer a aceleração da espermatogênese (VILELA, et al. 2003). Outro fato é que reversão sexual e produção de células germinativas anormais pode ocorrer devido aumento na temperatura (ITO; YAMASHITA; STRÜSSMANN, 2003). Além disso, danos as células germinativas e a morfologia testicular ocorrem em animais expostos a temperaturas altas, culminando em esterilidade parcial ou total dos indivíduos (ITO et al., 2003; SIQUEIRA-SILVA et al., 2015)

Avaliando o que foi citado, a temperatura pode influenciar na espermatogênese e no ciclo gonadal da espécie em estudo. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes temperaturas no ciclo testicular e na espermatogênese de *D. aequipinnatus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Exemplares machos, adultos de *Devario aequipinnatus* foram obtidos a partir de criadouros comerciais na região de Uberlândia, MG e encaminhados para o Laboratório de Ictiologia Neotropical – L.I.NEO, Unesp, Ilha Solteira, SP. Os animais foram acondicionados por um período de aclimatização em aquários com 60x35x40 cm de altura (64 litros), com sistema de filtragem, aeração constante, e temperatura controlada em 24 °C, e fotoperíodo ajustado em 12:12.

Os animais foram alimentados diariamente, duas vezes ao dia, com ração comercial extrusada Tetramim®, que apresenta em sua composição 47% de proteína bruta; 8,8% de lipídeos e 2% de fibras. A limpeza dos aquários ocorreu a cada dois dias, para minimizar os agentes estressores.

Ao longo do experimento, a quantidade de amônia na água se manteve estável, variando de 0,00 a 0,25 ppm. Em relação a temperatura, a variação média foi de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Não houve mortalidade.

2.2.DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi dividido em três tratamentos de acordo com a temperatura analisada, 18 °C, 24 °C e 30 °C. Um sistema de três aquários de 30x15x20 cm de altura (9 litros), interligados e com condições controladas, formavam uma unidade experimental.

Para cada tratamento foram utilizados 60 animais, distribuídos na unidade de experimentação (20 indivíduos em cada aquário). Inicialmente os animais foram mantidos a uma temperatura de 24 °C, por 7 dias, pois segundo Riehl e Baensch (1991), esta é a temperatura de conforto para esta espécie em ambiente natural. Após este período de ajuste, uma unidade experimental foi mantida a 24 °C, enquanto que nas demais houve uma diminuição ou aumento de 1 °C por dia, até atingir a temperatura de 18 °C e 30 °C, respectivamente.

2.3.COLETAS

Foram realizadas 10 coletas, sendo que cinco indivíduos de cada tratamento foram coletados em um intervalo de 4 dias, no período entre 1º e 37º dia após o início do experimento.

Os exemplares de *D. aequipinnatus* foram anestesiados com solução alcoólica de benzocaína (ROSS; ROSS, 1984). Em seguida, foram aferidos o comprimento padrão (cm), comprimento total (cm), massa do peixe (g) e massa da gônada (g) para cada exemplar. Os testículos foram removidos por meio de uma incisão na região ventral do animal, no sentido pôstero – anterior.

2.4.PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Os testículos coletados foram fragmentados e fixados em paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen, 0,1M a pH 7,2, por pelo menos 24 horas. Após a fixação os fragmentos testiculares foram desidratados em solução alcoólica, em série crescente de concentração e embebidos em glicol metacrilato (Technovit 7100/historesina). Foram seccionados a 3,0 µm de espessura em micrótomo equipado com navalha de vidro LEICA RM 2245 e corados com Hematoxilina e Eosina, Azul de Toluidina e Metanil-Yellow + Hematoxilina Férrica.

O fotoprocessamento foi realizado sob microscópio óptico Zeiss equipado com câmera AXIOCAM-MRc5. O mesmo programa foi utilizado para medição das espermatogônias.

Todos os procedimentos de coleta, processamento e análise foram realizados no Laboratório de Ictiologia Neotropical, Departamento de Biologia e Zootecnia – UNESP/FEIS.

2.5. ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO

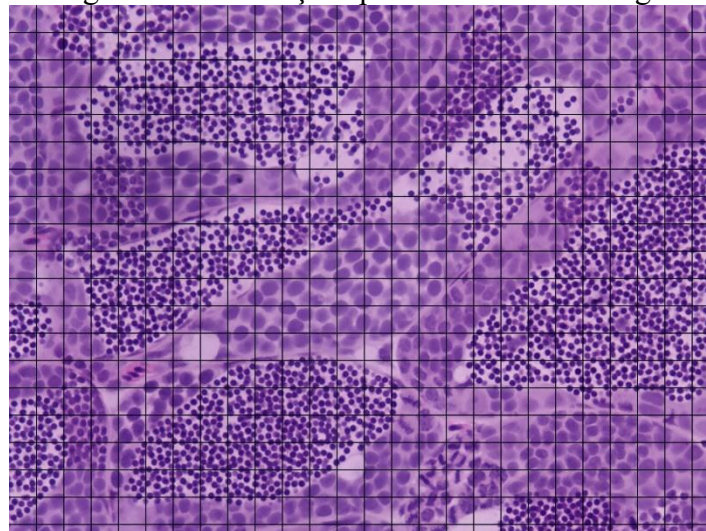
Foi avaliado o índice gonadosomático (IGS) que determina a relação da massa gonadal em relação à massa corporal do animal, em porcentagem, sendo [$IGS = (massa\ das\ gônadas/massa\ corpórea) \times 100$] (VAZZOLER,1981, 1996).

2.6. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

A análise estereológica foi realizada utilizando um “grid” de intersecção de 475 pontos (Motic Image Plus 2.0), sobreposto a uma área da secção histológica obtida a partir da região anterior do testículo dos espécimes. Considerou-se que cada “grid” equivalia a um campo e assim cinco campos (totalizando 2375 pontos) foram contados aleatoriamente, com magnificação de 400x, para cada animal (Figura 1).

Foram analisadas as quantidades dos seguintes componentes: espermatogônias, espermatócitos, espermátides, espermatozoides, células de Sertoli (quando sozinhas), células com núcleo picnótico, interstício e lúmen.

Figura 1 – Campo com o “grid” de intersecções para análise estereológica.



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

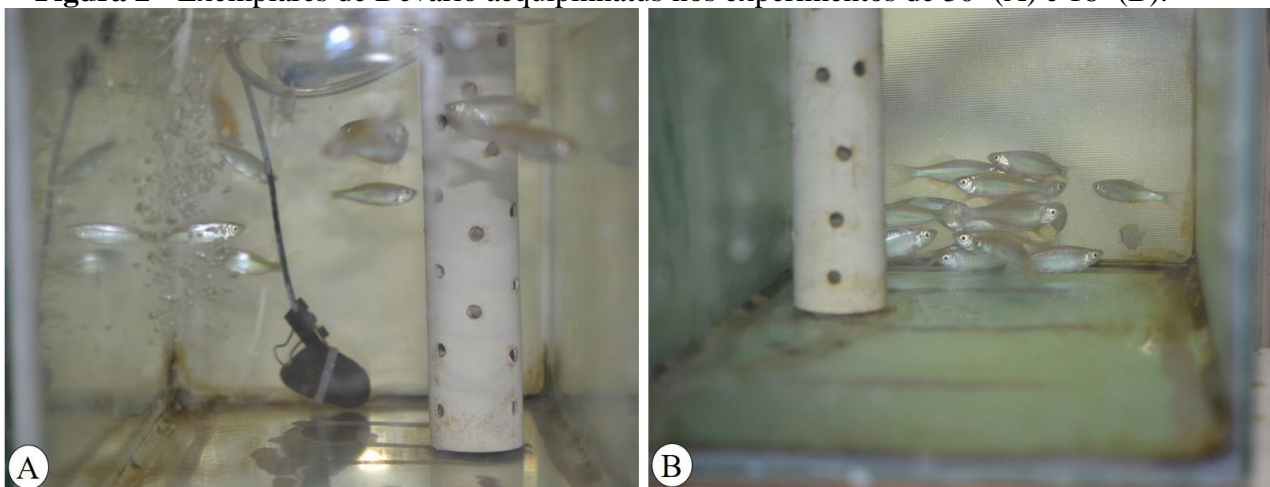
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aplicou-se aos dados o teste de homogeneidade de Bartlett e o teste de normalidade de Shapiro Wilk. Quando os dados apresentaram homogeneidade e normalidade, as análises foram conduzidas com ANOVA e teste de Tukey ($p < 0.05$). Nos casos em que não se apresentou homogeneidade e normalidade foi aplicado o teste de Kruskal Wallis. Os dados foram expressos pela média e desvio padrão.

3. RESULTADOS

Os peixes mantidos a 30°C mantiveram seu comportamento, tais como a dispersão no aquário, natação e alimentação, semelhante aos animais mantidos na temperatura conforto (24°) (Figura 2 A). Já os espécimes que foram mantidos a 18°C, apresentaram comportamento de agrupamento na parte final do aquário (Figura 2 B). Os movimentos de natação eram reduzidos a subir a superfície para se alimentarem e fuga da captura nos dias de coleta.

Figura 2 - Exemplares de *Devario aequipinnatus* nos experimentos de 30° (A) e 18° (B).



Fonte: Dados da pesquisa do autor

3.1. ESTRUTURA TESTICULAR DE *D. aequipinnatus*

D. aequipinnatus possui testículos pares e alongados individualizados por toda sua extensão e se unem na extremidade caudal, formando um único ducto espermático. O ducto testicular principal está localizado na periferia da gônada (Figura 3).

Os testículos são envoltos por um tecido conjuntivo, a túnica albugínea (Figura 3 e 4) que emite projeções para o interior do órgão dividindo a gônada em dois compartimentos, o compartimento intersticial e compartimento germinativo. Esses compartimentos possuem ramificações que não terminam na periferia do testículo, caracterizando o testículo como do tipo tubular anastomosado. O compartimento tubular é composto pelo epitélio germinativo (Figura 5), apoiado na membrana basal (Figura 4 e 5B), neste epitélio encontram-se as células somáticas de Sertoli e as células germinativas nos diferentes estágios (Figura 5A).

Com distribuição espermatogonial irrestrita (Figura 6), foram encontrados no epitélio germinativo espermatogônias do tipo A-indiferenciadas*, do tipo A-indiferenciadas, do tipo A-diferenciadas e espermatogônias secundárias ou do tipo B (Figuras 6, 7 e 9).

3.2.ESPERMATOGÊNESE EM *D. aequipinnatus*

A espermatogênese em *D. aequipinnatus* foi dividida em Fase Espermatogonial, Fase Espermatocitária e Espermiogênese, de acordo com as características morfológicas das células germinativas no epitélio germinativo testicular (Leal et al., 2009)

3.2.1. Fase Espermatogonial

Para distinguir as linhagens espermatogoniais presentes em *D. aequipinnatus* foram utilizadas características como: formato nuclear, evidência e quantidade de nucléolos, tamanho da célula e condensação da cromatina.

Espermatogônias do tipo A – Indiferenciadas* (Aind*)

As espermatogônias Aind* são as maiores células germinativas ($34,01 \pm 5,19 \mu\text{m}$), estão isoladas e dispersas ao longo do epitélio germinativo. Possui núcleo pouco basófilo e de contorno irregular, podendo apresentar um ou mais nucléolos, (Figura 6, 7, 9A, 10, 11B).

Espermatogônias do tipo A – Indiferenciadas (Aind.)

Assim como a Aind*, as espermatogônias do tipo Aind. encontram-se isoladas e dispersas no epitélio. Porém, são menores ($21,5 \pm 2,37 \mu\text{m}$), possuem núcleo alongado e mais basófilo do que a linhagem anterior. Possui nucléolo evidente e único (Figuras 6, 7, 8B, 9A, 10A, 11B).

Espermatogônias do tipo A – Diferenciadas (Adif.)

As espermatogônias do tipo Adif. ($16,68 \pm 1,72 \mu\text{m}$) estão agrupadas em cistos de duas ou mais células. Possui núcleo redondo, bem evidente, com um único nucléolo (Figuras 6, 7, 8A, 9A, 10B, 11A).

Espermatogônias do tipo B

Espermatogônias do tipo B, ou espermatogônias secundárias, estão agrupadas em cistos, com inúmeras de células. São menores ($10,26 \pm 1,66 \mu\text{m}$) em comparação as anteriores, possuem núcleo redondo e basófilo. Nucléolo pouco evidente em algumas células (Figuras 6, 7, 8, 9, 10B, 11A). As espermatogônias B são as últimas células da linhagem espermatogonial.

3.2.2. Fase Espermatocitária

Por meio das características nucleares como tamanho, condensação, basofilia e figuras meióticas, pôde-se distinguir os espermatócitos em:

Espermatócitos em Leptóteno e Zigóteno

Os espermatócitos em leptóteno e zigóteno possuem núcleo redondo, basófilos, indicando uma maior condensação da cromatina, de forma homogênea. Nessa fase da prófase I inicia a compactação cromossômica para a formação do complexo sinaptonêmico (Figura 8).

Espermatócitos em Paquíteno

Os espermatócitos em paquíteno apresentam núcleo mais basófilo do que os espermatócitos na fase anterior, com maior compactação cromossômica. (Figura 8A).

Espermatócitos em Diplóteno

Na fase de diplóteno, os espermatócitos alcançam o máximo de condensação da cromatina; e esta cromatina se apresenta na região periférica do núcleo. Os espermatócitos em diplóteno também podem ser encontrados juntamente com figuras metafásicas (Metáfase I) (Figura 8B).

Espermatócito Secundário

Os espermatócitos secundários são caracterizados por apresentarem núcleo arredondado e cromatina densa disposta na periferia do núcleo. Espermatócitos secundários são menores em relação aos anteriores (Figura 8A, 9).

3.2.3. Espermio gênese

Em *D. aequipinnatus* foram observados dois tipos de espermátides ao longo da espermio gênese. As espermátides foram identificadas e diferenciadas de acordo com as características morfológicas como tamanho das células, compactação nuclear e espaço no interior dos cistos.

Espermátide Inicial

As espermátides iniciais são menores comparadas as células espermatogoniais e os espermatócitos; e se apresentam comprimidas dentro dos cistos. O núcleo dessas células é redondo, e com cromatina mais condensada, em relação as células das fases anteriores (Figura 9B, 10A, 11B).

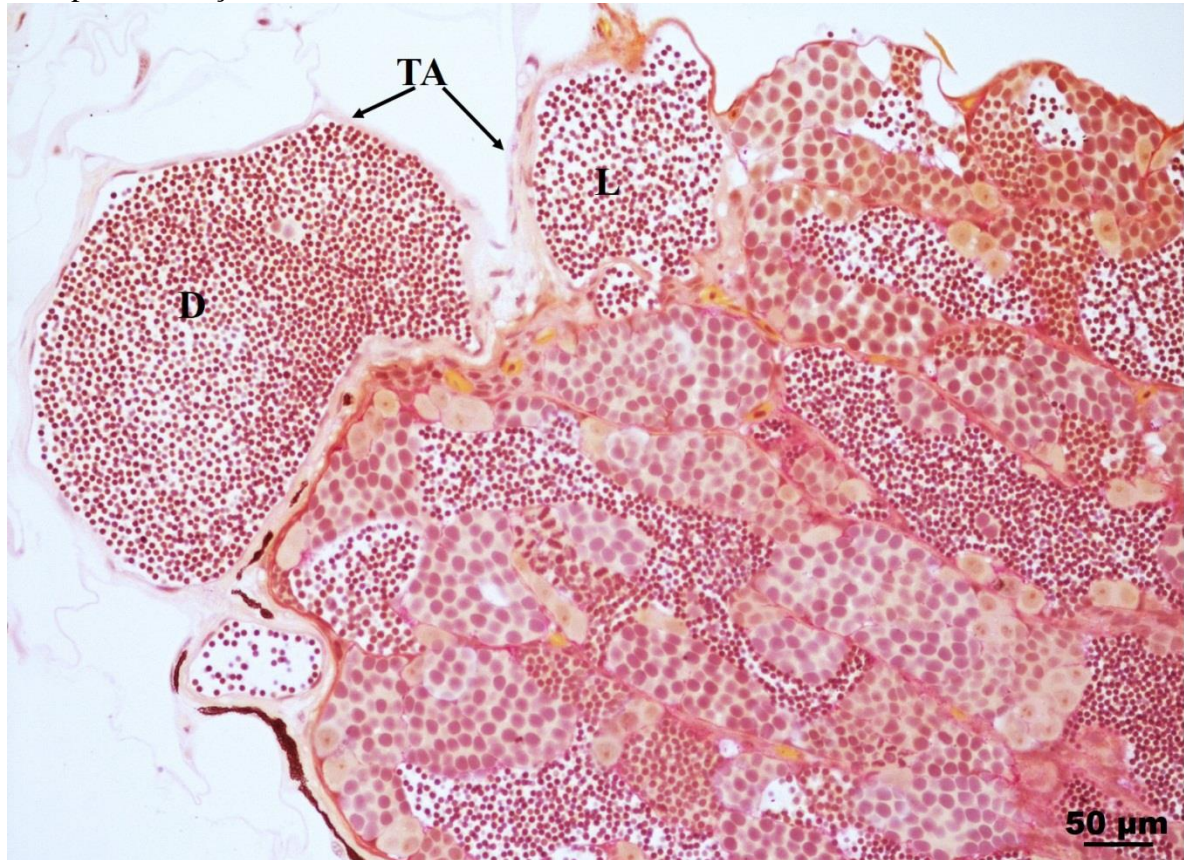
Espermátide Final

Espermátides finais são menores do que as espermátides iniciais, seus núcleos possuem cromatina totalmente condensada e citoplasma é reduzido.

Nesse estágio, há um espaçamento maior entre as espermátides e é possível a visualização do flagelo (Figuras 8, 9B, 10, 11).

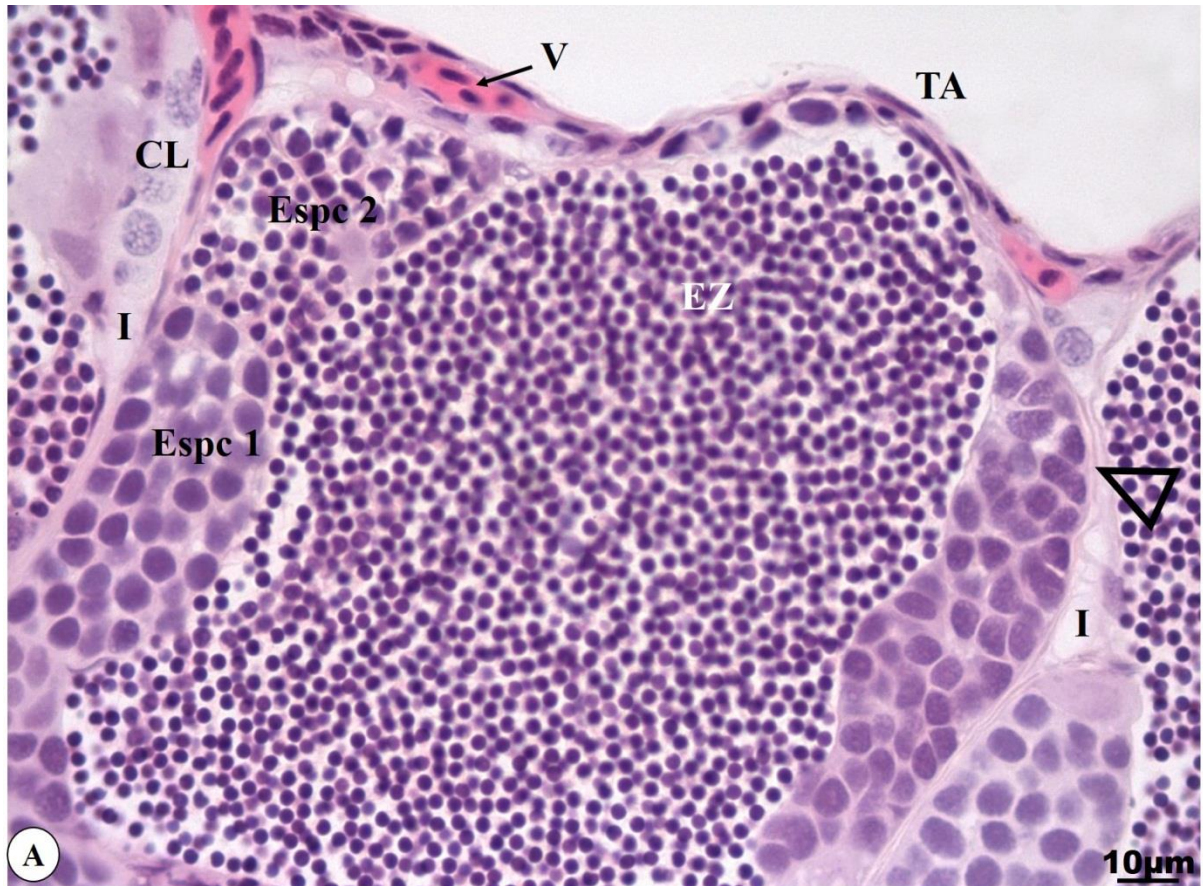
Por fim, ao final da espermatogênese são formados os espermatozoides, as menores células de todo o processo, que são encontrados no lúmen dos túbulos (Figuras 6, 10).

Figura 3 - Corte transversal - Testículo de *D. aequipinnatus* - Ducto Testicular Principal. Coloração: PAS Metanil Yellow e Hematoxilina Férrica.



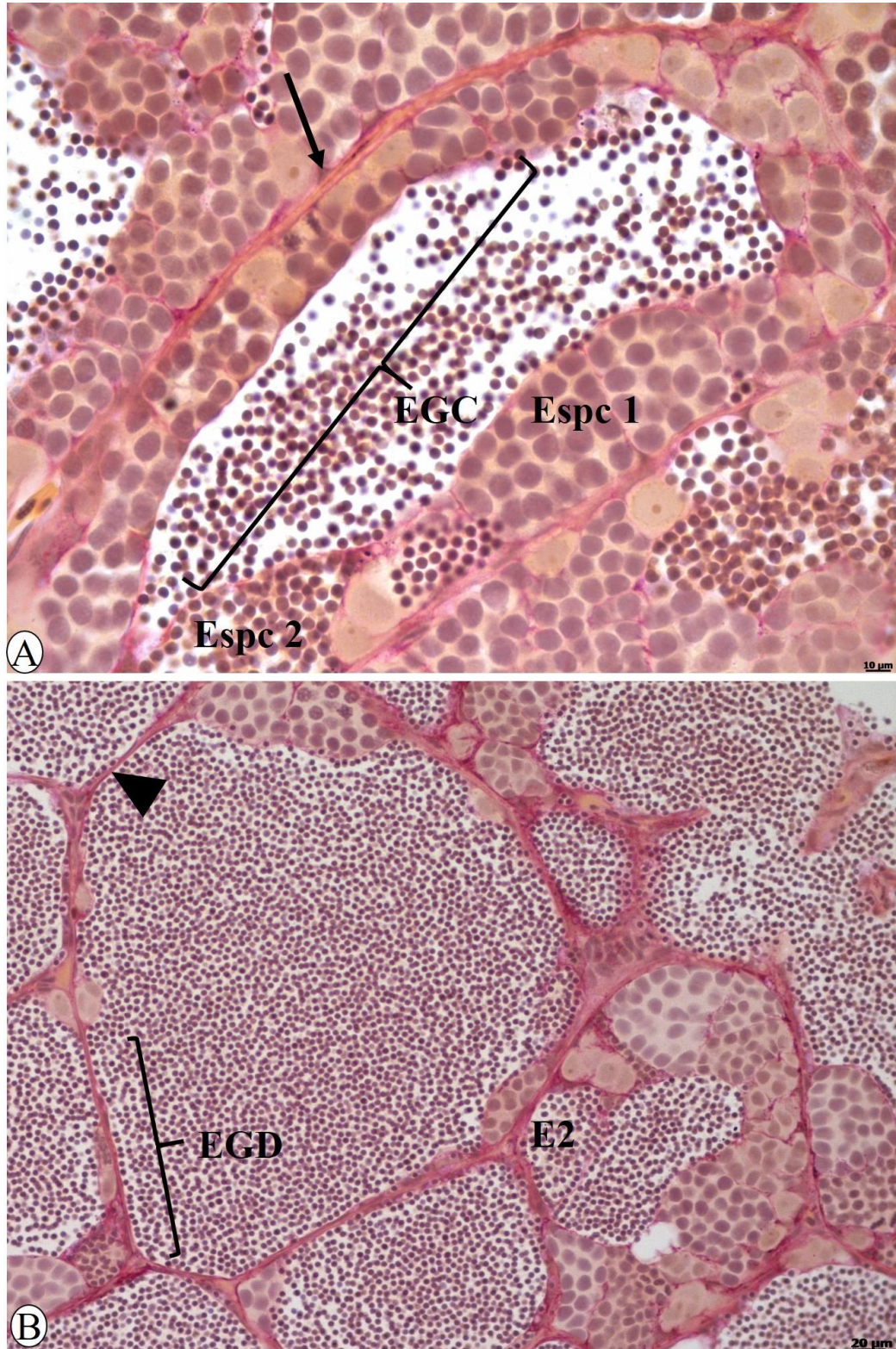
Fonte: Dados da pesquisa do autor

Figura 4 - Corte longitudinal - Testículo de *D. aequipinnatus* envolto pelo tecido conjuntivo, denominado túnica albugínea (TA). O tecido conjuntivo divide a gônada em dois compartimentos, o interstício (I), onde encontra-se as células de Leydig (CL), e o compartimento germinativo, apoiado sobre a membrana basal (cabeça de seta vazada) onde se desenvolve as células nos diferentes estágios, como espermátocitos primários (Epsc 1) e secundário (Epsc 2). V: vaso sanguíneo. Ez: Espermatozoide **Coloração:** HE



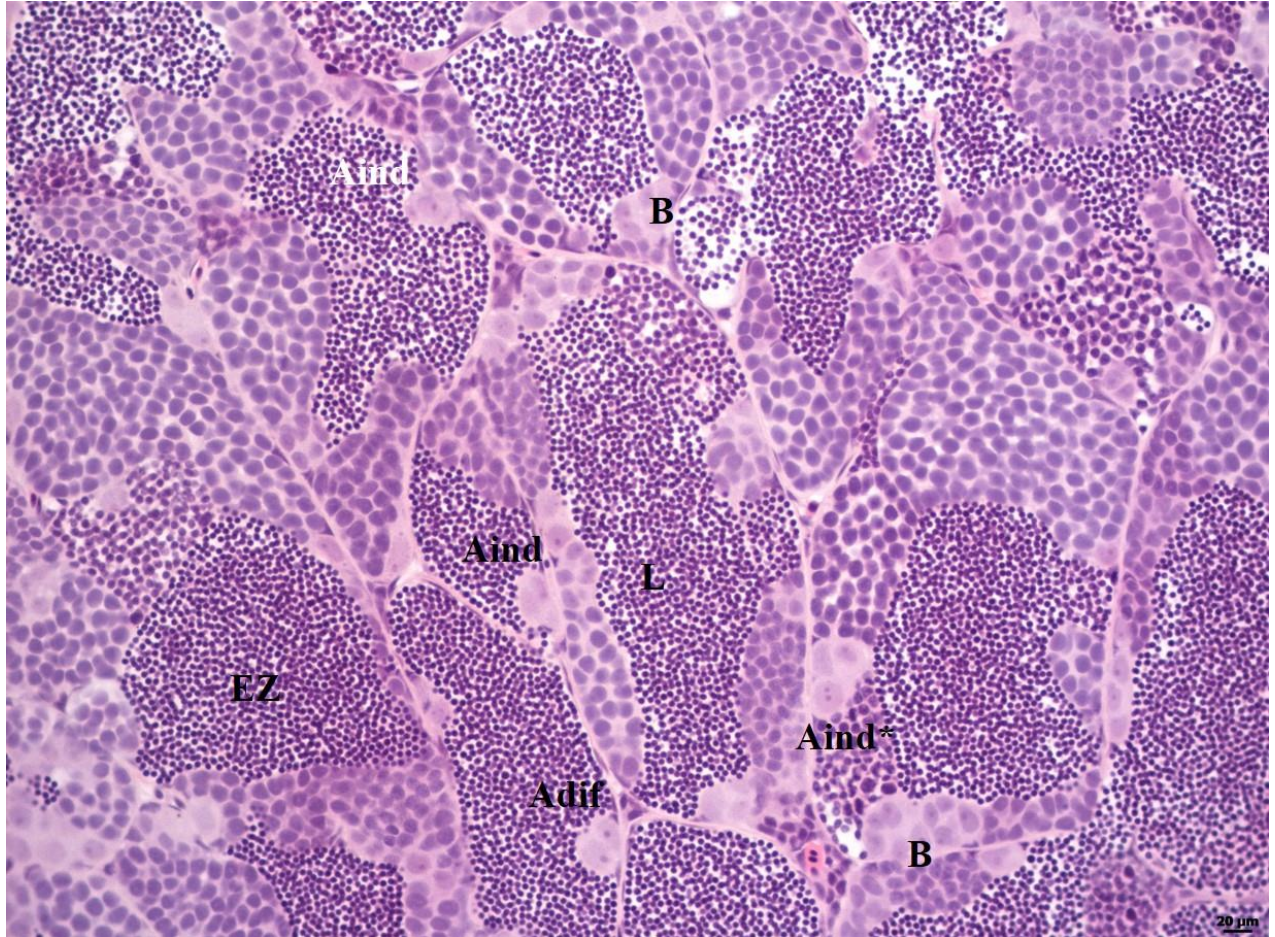
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 5 - Corte longitudinal dos testículos de *D. aequipinnatus* **A:** Região tubular com epitélio germinativo contínuo (EGC), com vários espermatocistos contendo células germinativas em desenvolvimento sincrônico. **B:** Túbulos com Epitélio germinativo descontínuo (EGD), com alguns espermatocistos remanescentes. Cabeça de Seta = Membrana Basal. Seta = Célula de Sertoli. **Coloração:** PAS Metanil Yellow e Hematoxilina Férrica.



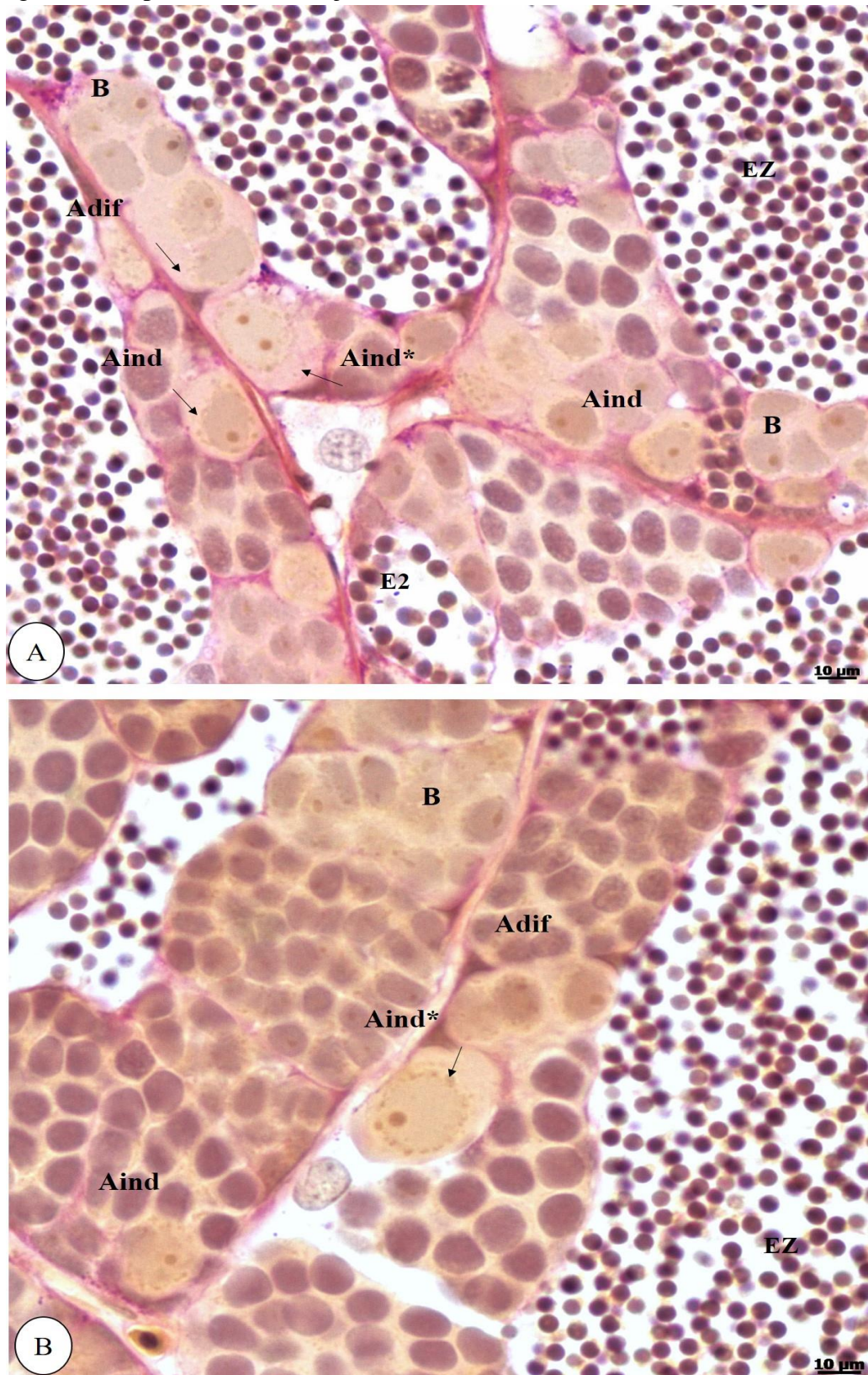
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 6 – Corte longitudinal dos testículos de *D. aequipinnatus*. Distribuição irrestrita das espermatogônias. Espermatogônias do tipo A indiferenciadas (Aind*), espermatogônias do tipo A indiferenciadas (Aind), espermatogônias do tipo A diferenciadas (Adif), cistos de espermatogônias do tipo B. (B) L = lúmen, EZ = Espermatozoide. **Coloração:** HE.



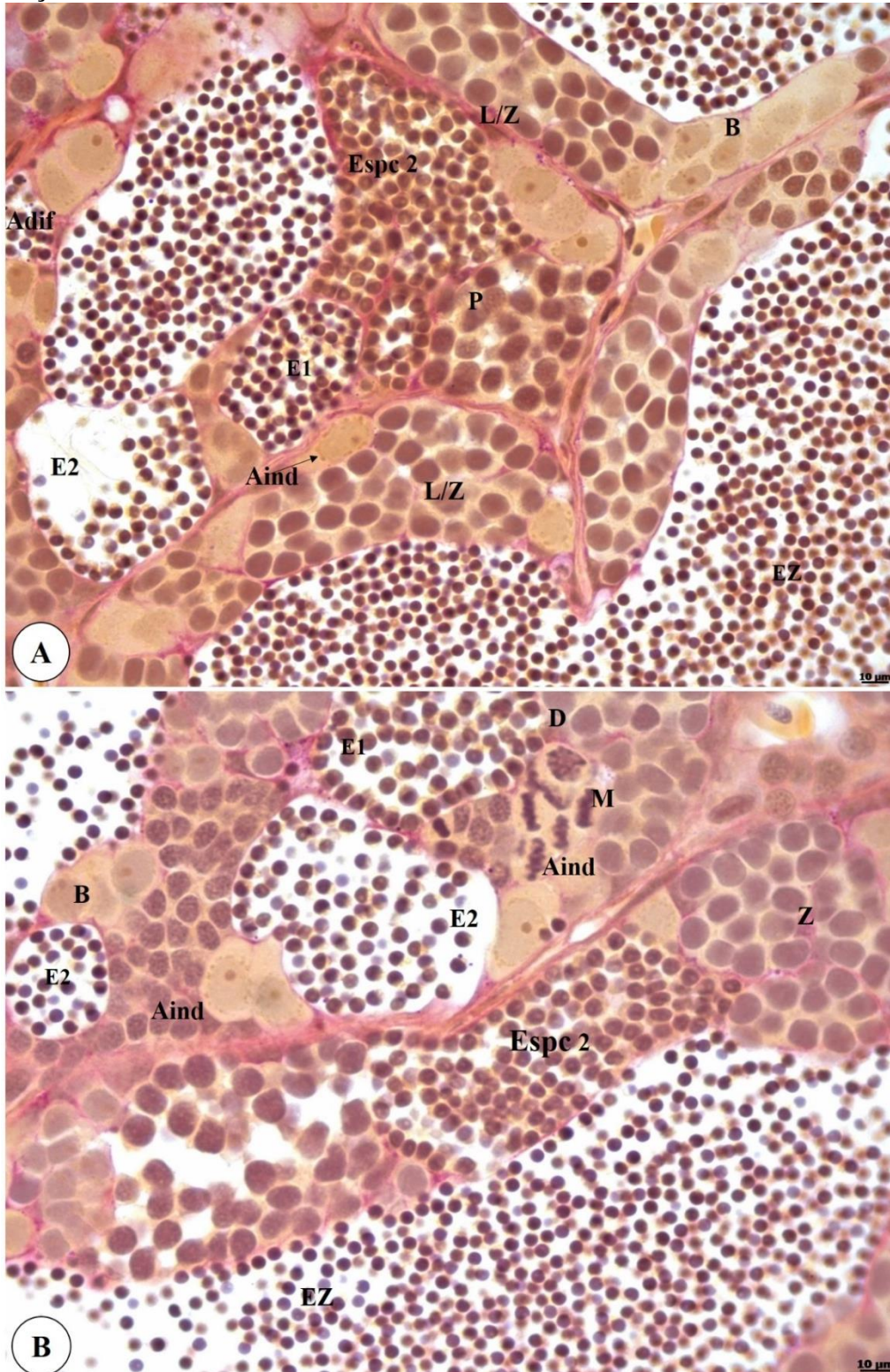
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 7 - Corte longitudinal - Testículo de *D. aequipinnatus*. **A - B**: Espermatogônia do tipo A indiferenciada (Aind*), tipo A indiferenciada (Aind), tipo A diferenciada (Adif), cistos de espermatogônias do tipo B (B). **Coloração**: PAS Metanil Yellow e Hematoxilina Férrica.



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 8 – Corte longitudinal - Testículo de *D. aequipinnatus*. **A - B:** cistos de espermatogônias do tipo B (B), espermatocistos contendo espermatócitos em leptóteno (L), em zigóteno (Z), em paquíteno (P), em diplóteno (D), espermatócitos secundários (Epsc 2), espermátides iniciais (E1), espermátides finais (E2) e espermatozoides (EZ) na luz do lúmen. **Coloração:** PAS Metanil Yellow e Hematoxilina Férrica.



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

3.3. CICLO TESTICULAR EM *D. aequipinnatus*

De acordo com a definição das fases de maturação testicular proposta por Grier, (2002) e com base nas proporções das células germinativas, juntamente com as características do epitélio, contínuo e descontínuo, foi possível definir as seguintes fases de maturação:

3.3.1. Maturação Intermediária

Nesta fase, há a presença de uma grande quantidade de espermatogônias (Figura 9A). O epitélio germinativo é contínuo na região central da gônada, em alguns túbulos os espermatocistos estão preenchendo todo o lúmen, e não é possível ver a luz. No entanto, nas periferias, inicia-se a descontinuidade do epitélio, caracterizando a fase de maturação intermediária. Os túbulos seminíferos estão preenchidos principalmente de espermatócitos primários e secundários; em menor quantidade há cistos de espermátides e poucos espermatozoides na luz (Figura 9).

3.3.2. Maturação Final 1

No epitélio, há cistos de células germinativas nos diferentes estágios, com predominância daqueles contendo espermatócitos e espermátides (Figura 10 A e B).

Nesta fase intensifica-se a liberação dos espermatozoides que estão em cistos nos túbulos periféricos (Figura 10 A), e a liberação dos espermatozoides na região central, resultando em uma descontinuidade do epitélio em toda a gônada. (Figura 10 A e B).

Em relação a população de células da linhagem espermatogonial, é possível encontrar as quatro gerações de espermatogônias (Figura 10 B), tanto próximas a túnica albugínea, como nas porções mais centrais da mesma.

3.3.3. Maturação Final 2

Com o avanço da espermatogênese, o lúmen testicular torna-se cada vez preenchido por espermatozoides, principalmente na periferia da gônada (Figura 11 A). A descontinuidade do epitélio, que na fase anterior, era inicial e semelhante ao longo da gônada, agora é mais visível na periferia do testículo, pois o lúmen está completamente preenchido por espermatozoides e alguns cistos remanescentes (Figura 11 A).

Na porção central da gônada, o epitélio germinativo nos túbulos se assemelham ao da fase anterior, isto é, há a presença de cistos de espermatócitos e espermátides (Figura 11 B), porém é descontínuo.

As espermatogônias se apresentam preferencialmente na região central da gônada, onde há mais cistos no epitélio germinativo. No entanto, é possível encontrar espermatogônias remanescentes nos túbulos periféricos (Figura 11 A e B).

3.3.4. Maturação Final 3

Esta fase é caracterizada pelo avanço da espermatogênese, principalmente da porção central da gônada, onde haviam muitos espermatocistos. O epitélio é totalmente descontínuo, e há raros cistos dispersos nos túbulos (Figura 12 A e B).

Estes cistos são, em sua maioria cistos contendo espermatócitos primários e secundários (Figura 12 A e B). Nestas regiões, observa-se escassas espermatogônias (Figura 12 B).

3.3.5. Maturação Final 4

Nessa fase, todo o epitélio germinativo é descontínuo. O lúmen dos túbulos é completamente ocupado por espermatozoides (Figura 13 A - C). As espermatogônias estão praticamente ausentes nesta fase.

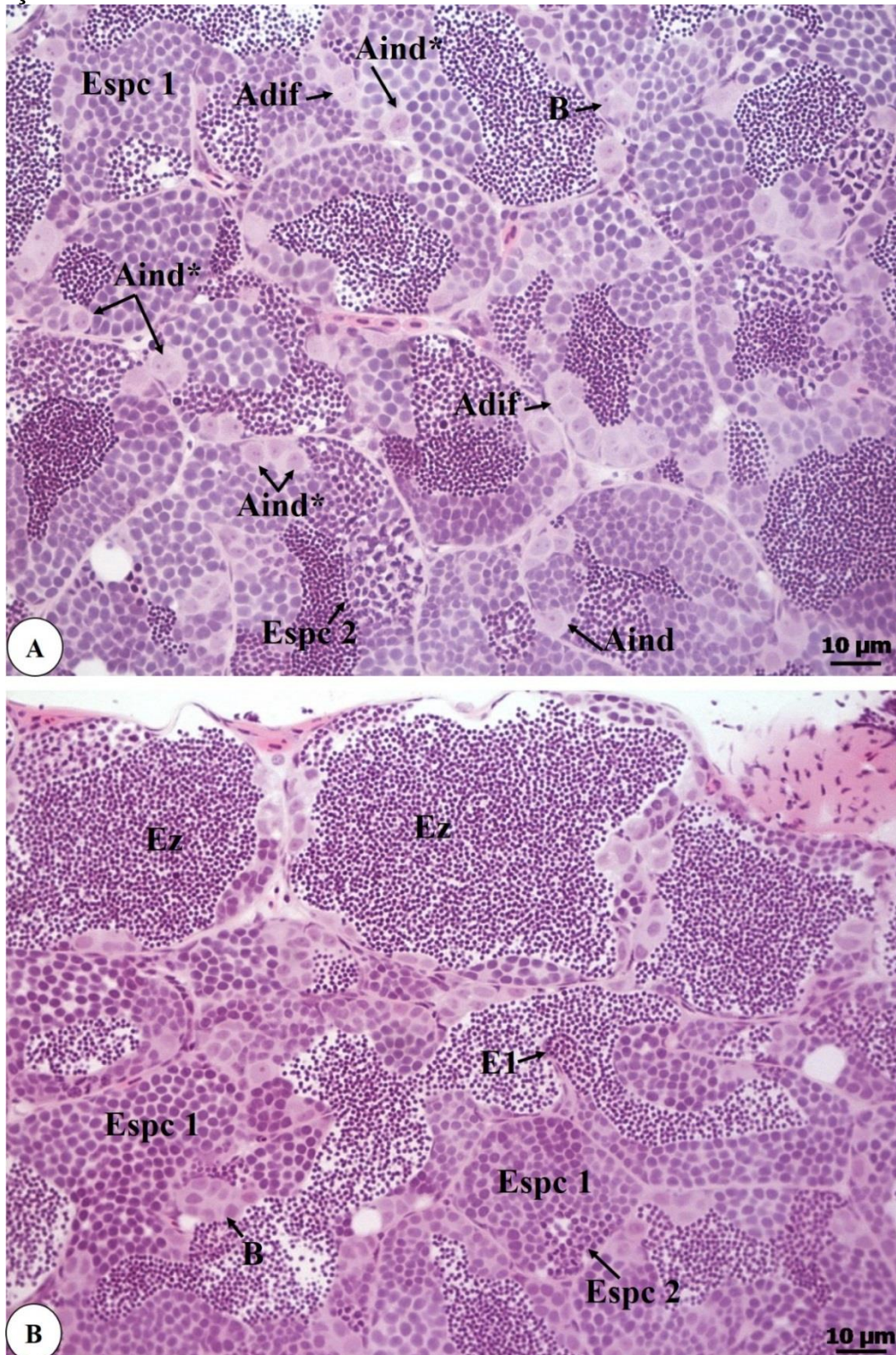
Nessa fase o testículo tem função de estocagem de espermatozoides, já que não há proliferação celular e os túbulos estão repletos deles (Figura 13 A - C).

3.3.6. Regressão

Como não ocorre a reprodução nas condições deste experimento, os espermatozoides são absorvidos gradativamente pelas células de Sertoli, processo que teve início na fase anterior. As células de Sertoli emitem projeções citoplasmáticas para englobar os espermatozoides e assim reabsorvê-los (Figura 14).

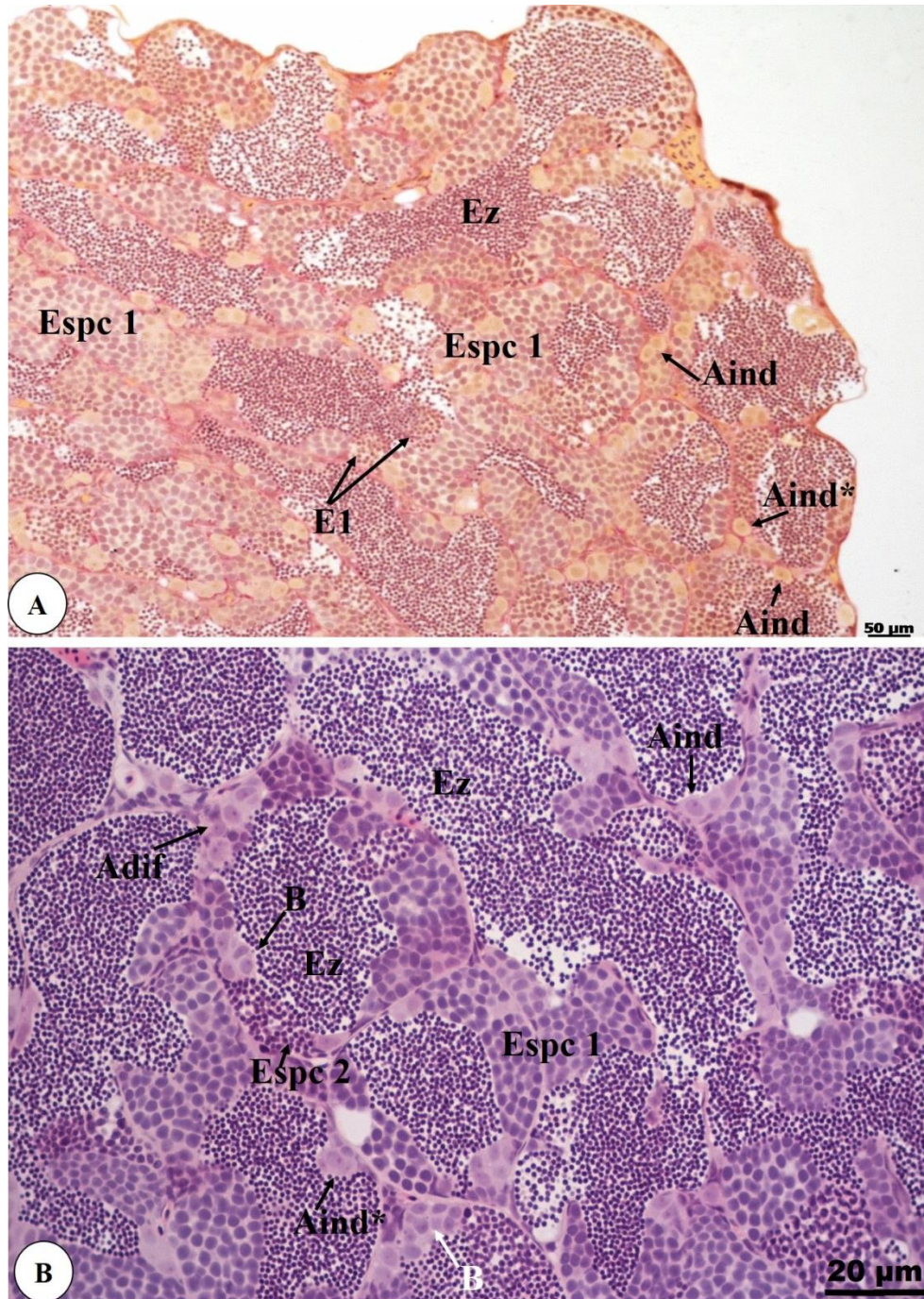
Apesar do lúmen permanecer repleto de espermatozoides, os mesmos estão mais dispersos (Figura 14 A). No epitélio germinativo são observadas espermatogônias isoladas (Aind*, Aind) e cistos de espermatogônias (Adif. e B) (Figura 14 B e C). Portanto, em *D. aequipinnatus*, a regressão ocorre juntamente com a proliferação espermatogonial.

Figura 9 – Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Fase de Maturação Intermediária. **A:** Porção central da gônada, com túbulos seminíferos apresentando epitélio contínuo e a presença de espermatogônias do tipo A indiferenciada* (Aind*), A indiferenciada (Aind), A diferenciada* (Adif) e do tipo B (B), espermatocistos primários (Epsc 1) e secundário (Epsc 2). **B:** Porção periférica da gônada com epitélio germinativo descontínuo. Apresentam espermatogônia do tipo B (B), espermatocistos primários (Epsc 1) e secundário (Epsc 2) e espermátides primárias (E1), e espermatozoides na luz (EZ). **Coloração:** A e B: HE.



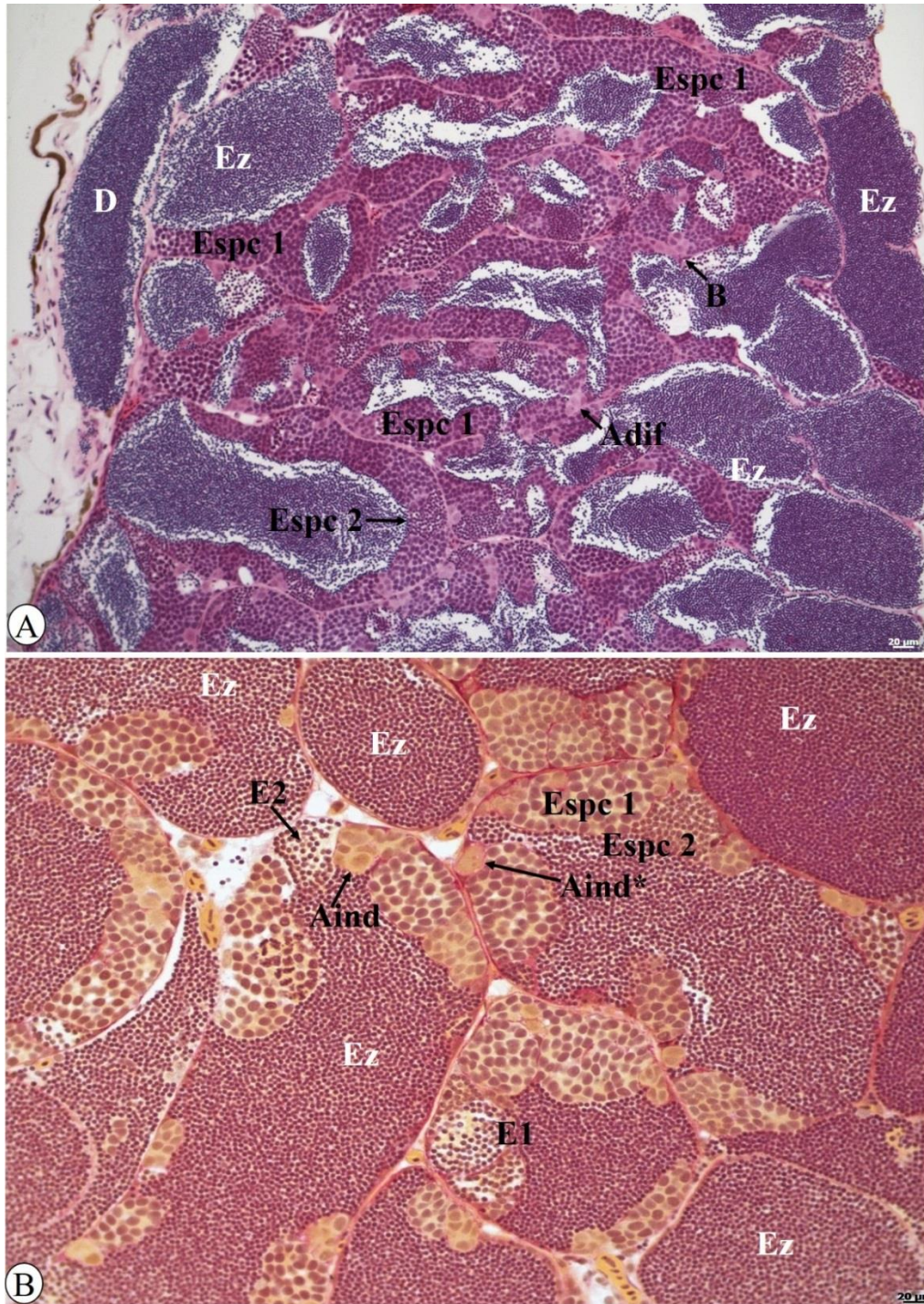
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 10 – Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Fase de Maturação Final 1. **A:** Porção periférica da gônada, com epitélio germinativo descontínuo e lúmen contendo espermatozoides (EZ). Ainda são encontrados espermatogônias do tipo A indiferenciada* (Aind*), A indiferenciada (Aind), cistos de espermatócitos primários (Epsc 1) e espermátides primárias (E1). **B:** Com o avanço da espermatogênese, a descontinuidade que se encontrava nas periferias da gônada avançou para a porção central, com a presença de espermatozoides (EZ) no lúmen e espermatogônias do tipo A indiferenciada* (Aind*), A indiferenciada (Aind), A diferenciada (Adif), do tipo B (B) e cistos de espermatócitos primários (Epsc 1) secundários (Epsc 2). Coloração A: PAS, Metanil Yellow e Hematoxilina férrica. B: HE.



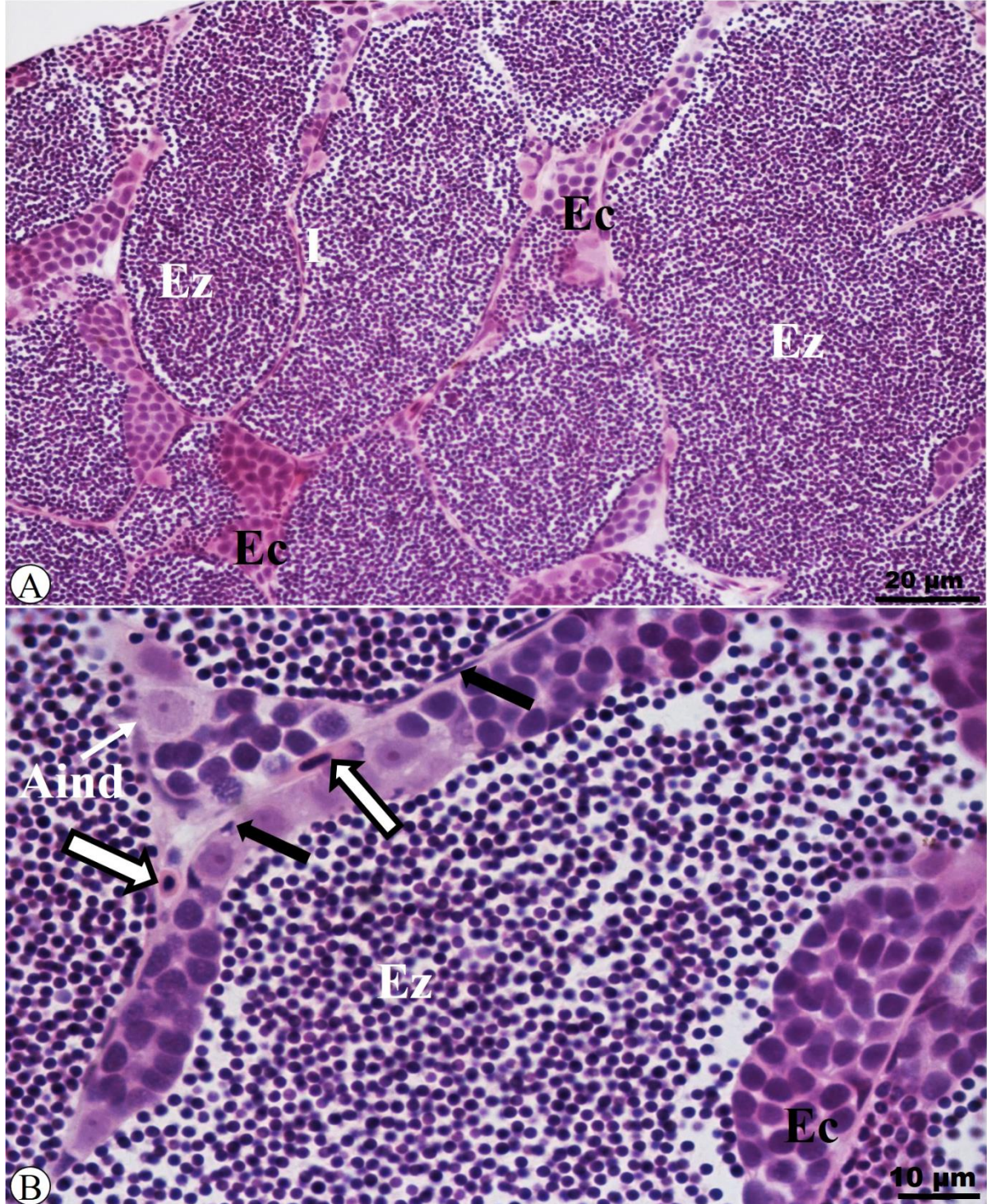
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 11 - Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Fase de Maturação Final 2. **A:** Epitélio germinativo dos túbulos situados na periferia totalmente descontínuo, e lúmen (L) preenchido de espermatozoides (EZ). Na porção central da gônada o epitélio pode ser contínuo (em raros casos) ou descontínuo. Presença espermatogônias A diferenciadas (Adif) e B (B) e de cistos de espermatócitos primários (Epsc 1) e secundários (Epsc 2). **B:** Porção central da gônada com epitélio descontínuo. Ainda é possível encontrar espermatogônias (Aind* e Aind), e também a presença de cistos de espermatócitos primários (Epsc 1), secundários (Epsc 2) e espermátides (E1 e E2). D = Ducto espermático. **Coloração A:** HE, **B:** PAS, Metanil Yellow e Hematoxilina Férrica.



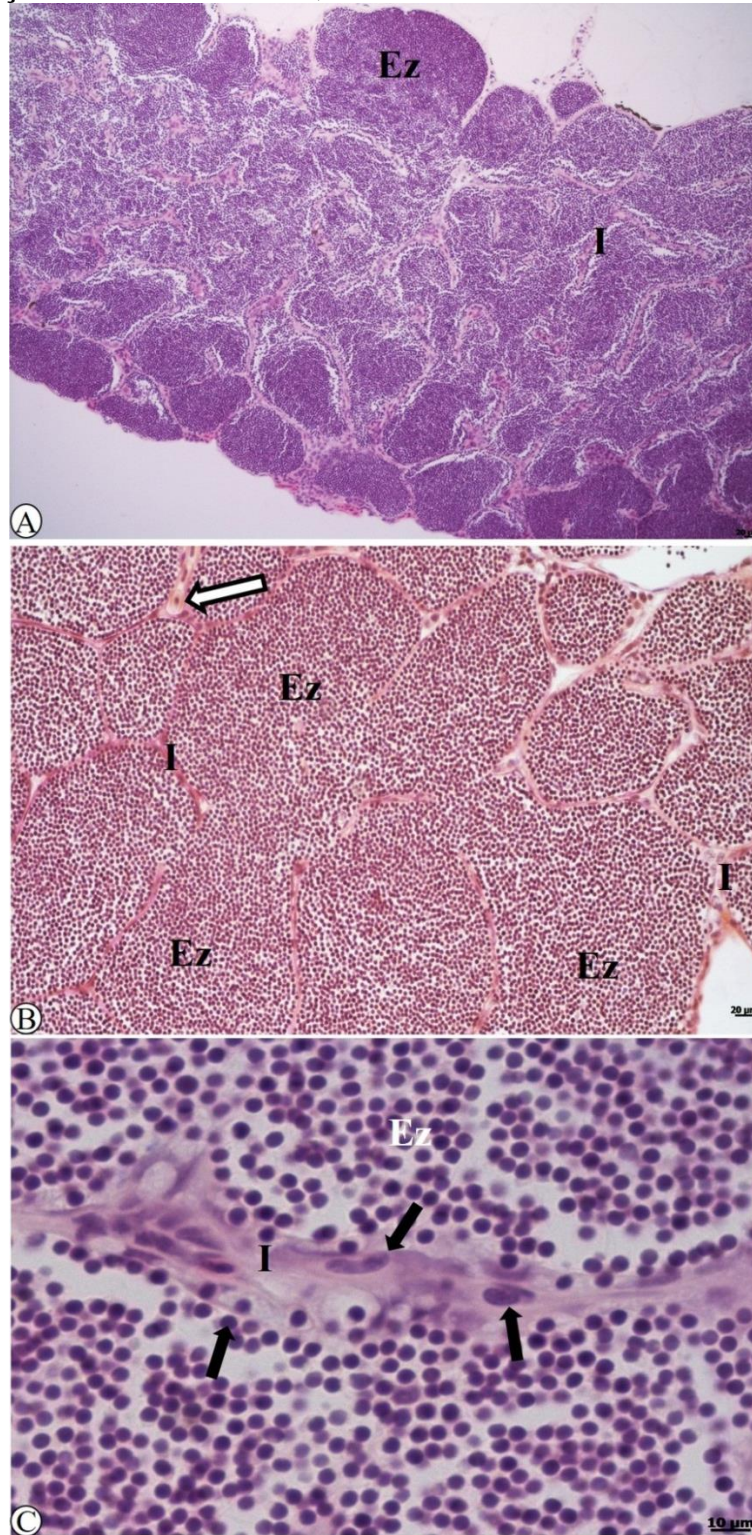
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 12 - Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Fase de Maturação Final 3. **A:** Epitélio descontínuo, com alguns espermatocistos (Ec) dispersos, lúmen preenchido por espermatozoides (Ez). **B:** Aumento da região com espermatocistos (Ec) e espermatogônias do tipo A indiferenciada remanescentes. I: Interstício. Seta = Célula de Sertoli. Seta vazada= Células sanguíneas. **Coloração:** HE



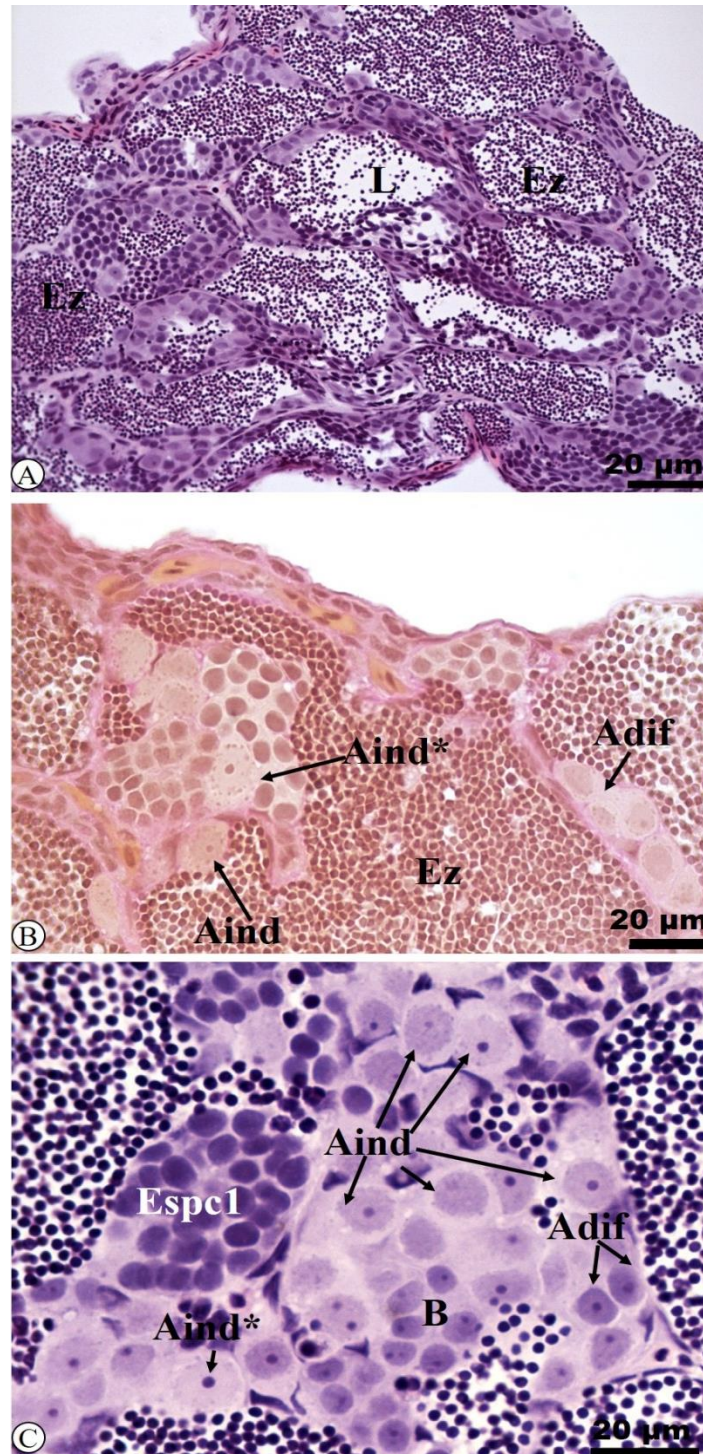
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 13 - Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Fase Maturação Final 4. **A e B:** Visão macroscópica do testículo em maturação fina 4, apresentando epitélio totalmente descontínuo, espermatocistos ausentes, lúmen totalmente preenchido por espermatozoides (Ez). **C:** Detalhe do interstício (I) onde estão as células de Sertoli (Seta), com projeções citoplasmáticas que envolvem espermatozoides. Seta vazada= Células sanguíneas. **Coloração:** A e C: HE. B: PAS, Metanil Yellow e Hematoxilina Férrica.



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 14 – Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Fase de Regressão. **A:** Visão macroscópica da gônada em regressão com epitélio germinativo descontínuo, com espermatozoides (Ez) residuais no lúmen (L). **B e C:** Há vários cistos de espermatogônias, principalmente espermatogônias do tipo A indiferenciada*(Aind*) e indiferenciada (Aind). Há também espermatogônias do tipo A diferenciada (Adif) e do tipo B (B). Devido à grande quantidade de espermatogônias, a gônada está retomando o processo espermatogênico, por isso, a fase de regeneração ocorre juntamente com a fase de regressão. **Coloração:** A e C: HE. B: PAS, Metanil Yellow e Hematoxilina Férrica.



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

3.4. EFEITO DAS TEMPERATURAS NO CICLO TESTICULAR

3.4.1. Temperatura de 24 °C

Os espécimes de *D. aequipinnatus* utilizados para o experimento de 24 °C eram indivíduos com massa de valor médio $1,426 \pm 0,163$ g, e com comprimento padrão médio de $4,283 \pm 0,203$ cm.

Em relação as fases de maturação encontradas ao longo das coletas, temos que, sob temperatura de 24 °C, foram encontrados indivíduos em maturação final 2 em todas as coletas. Nas coletas 1 e 2 encontrou-se indivíduos em maturação final 2 e maturação final 3, principalmente. Somente nas coletas posteriores, coletas 3 e 5, que indivíduos em maturação 4 foram encontrados. Na coleta 6, a maior parte dos indivíduos (60%) estão em maturação 3. A partir daí, temos um retorno da gônada as fases iniciais, maturação intermediária e maturação final 1, da coleta 7 a 9. Na coleta 10 verificou-se indivíduos em maturação final 3, caracterizando a continuação do processo espermatogênico (Figura 15).

3.4.2. Temperatura de 18 °C

Os exemplares do experimento de 18 °C possuíam massa média de $1,788 \pm 0,279$ g e comprimento padrão médio de $4,721 \pm 0,192$ cm.

Cabe ressaltar que a fase de regressão foi encontrada somente em indivíduos mantidos a 18 °C. Animais em fase de maturação final 3 foram encontrados em 8 das 10 coletas. Na coleta 1, 60% dos indivíduos estavam em maturação final 4, seguidos de 20% de indivíduos em maturação 3 e em regressão. O número de espécimes em regressão aumentou na segunda coleta, 40%, seguidos do mesmo valor para indivíduos em maturação final 3 e 20% em maturação final 2. As coletas 3 e 4, são caracterizadas pela retomada do ciclo, devido a presença de fases iniciais encontradas neste experimento, e ainda de indivíduos em regressão. As coletas 5 a 8, apresentam um perfil semelhante, com a maioria dos indivíduos em maturação final 2 e 3. Há também a presença de indivíduos em maturação final 4, número que aumenta de 20% para 40% na coleta 8. Na coleta 9, encontramos indivíduos em regressão (20%) e maturação intermediária (40%), o que sugere o fim de mais um ciclo (Figura 15).

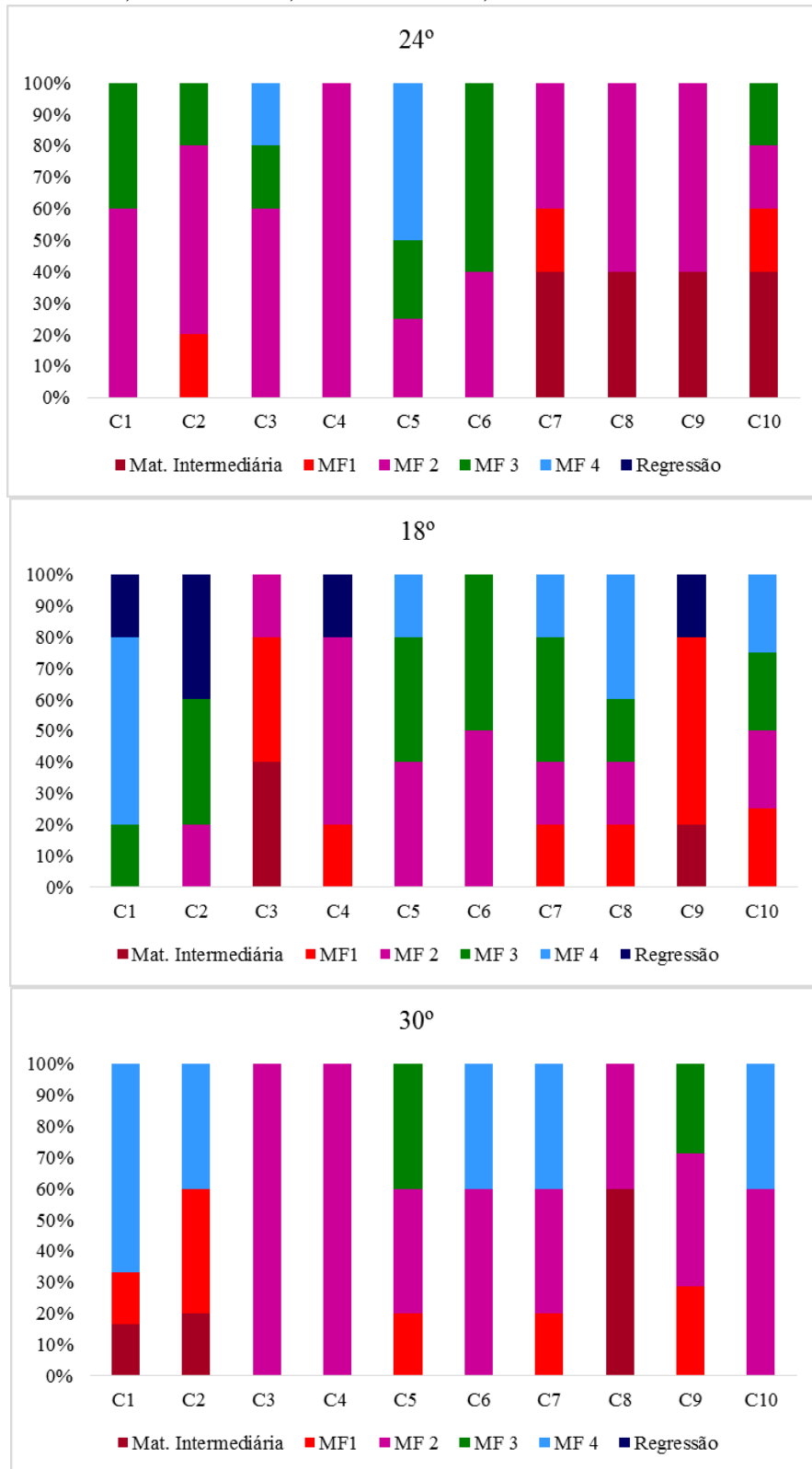
3.4.3. Temperatura de 30 ° C

Os animais utilizados neste experimento eram uniformes em tamanho com comprimento médio de $4,674 \pm 0,151$ cm, e massa média de $1,797 \pm 0,118$ g.

Nas coletas 1 e 2, temos a maioria dos animais aptos a reprodução, em maturação final 4 (60% na coleta 1 e 20% na coleta 2), e os que avançaram para maturação intermediária e final 1. Nas coletas 3 e 4, 100% dos indivíduos estão em maturação final 2, que se estende a coleta 5, porém em menor quantidade (40%). Na coleta 5 encontramos indivíduos em maturação final 3; nas coletas 6 e 7, foram encontrados 40% de indivíduos em maturação final 4, indivíduos aptos a reproduzirem, indicando mais um ciclo.

A retomada do ciclo é conferida na coleta 8, onde 60% dos indivíduos estão em maturação intermediária. Na coleta 9, temos indivíduos nas fases de maturação final 1, 2 e 3. Por fim, na coleta 10, embora a maioria dos indivíduos (60%) estejam em maturação final 2, 40% dos indivíduos estão em maturação final 4, indicando um menor tempo para alcançar o ápice de mais um ciclo reprodutivo (Figura 15).

Figura 15 – Frequência (em porcentagem) de indivíduos de *Devario aequipinnatus* por fases de maturação testicular, submetidos aos tratamentos de 18 °C, 24 °C, 30 °C. **Abreviaturas:** C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; C3: Coleta 3; C4: Coleta 4; C5: Coleta 5; C6: Coleta 6; C7: Coleta 7; C8: Coleta 8; C9: Coleta 9; C10: Coleta 10; 18:



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Diante disso, pode-se inferir que à temperatura conforto (24 °C), *D. aequipinnatus* teve um pico de indivíduos aptos a se reproduzirem no período de 37 dias. Nas condições de águas abaixo da temperatura conforto (18 °C) pôde-se averiguar um maior número de indivíduos em regressão, que não é evidenciado nas demais temperaturas. Além disso, verificou-se um período em que os indivíduos estão aptos a se reproduzir, sendo este mais longo, estendendo da coleta 5, 8 e 10. Sob temperatura elevada (30 °C) houve uma aceleração na espermatogênese, havendo 3 picos de reprodução ao longo do experimento.

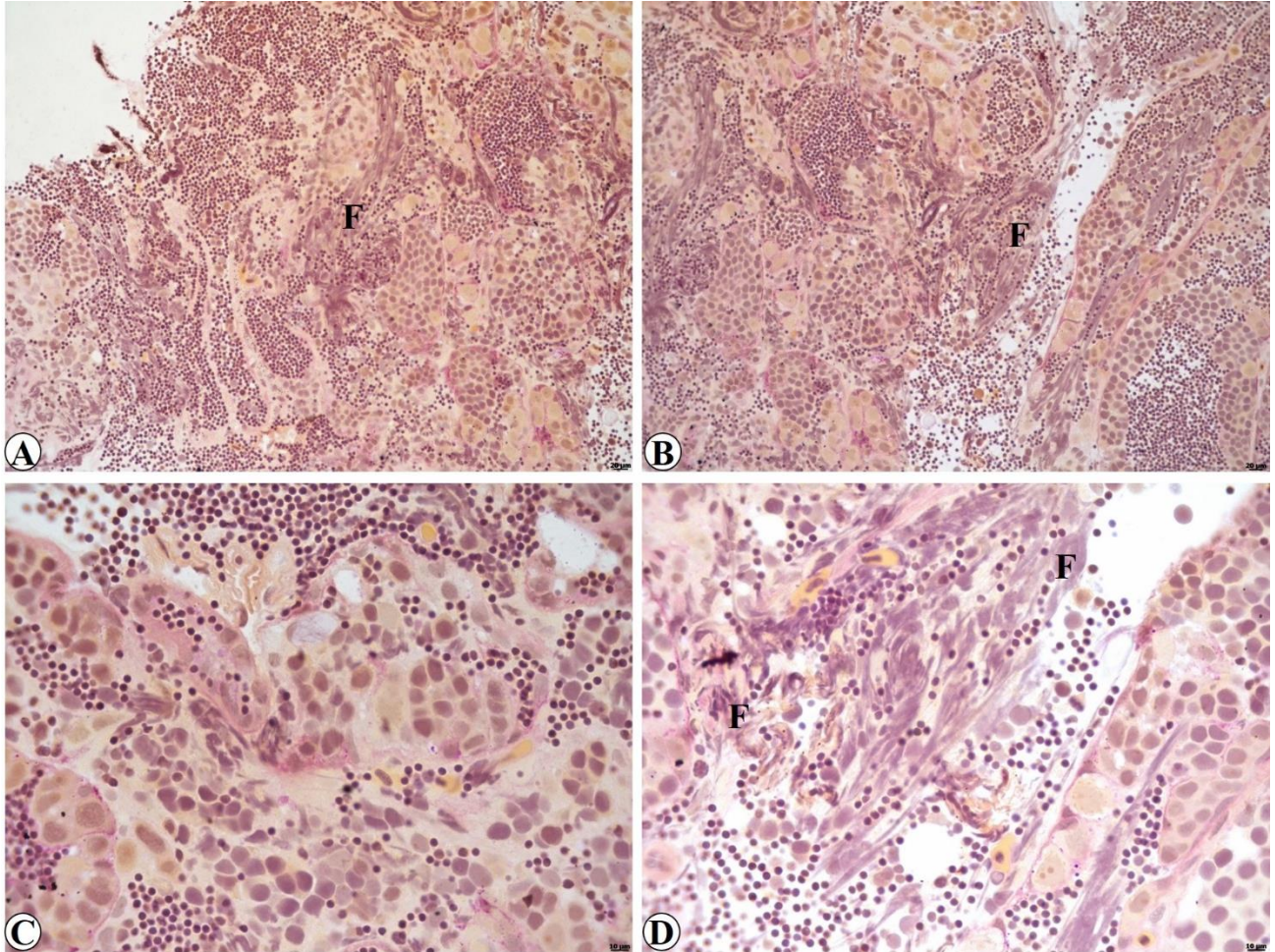
No entanto, a aceleração da espermatogênese culminou em alguns aspectos negativos a morfologia gonadal. A partir da coleta 6, quando os animais já estavam no 20º dia de exposição a águas de temperatura elevada (30 °C), pelo menos um indivíduo de cada coleta apresentou um aspecto gonadal diferente do que foi encontrado nos espécimes mantidos na temperatura conforto, em alguma região da porção estudada da gônada. Da mesma forma ocorreu com os exemplares mantidos a 18 °C. As gônadas apresentaram um aspecto desorganizado, ou seja, sem delimitação de túbulos e interstício, com espermatogênese suprimida nesta região (Figura 16). Foi observado filamentos, contra corados com hematoxilina férrica na coloração de PAS e Metanil Yellow, que aparentemente são miofibroblastos (Figura 16), no entanto, para afirmar, é necessária uma técnica de microscopia eletrônica. Além disso, foi evidenciado inúmeros cistos com células picnóticas.

Sob temperatura baixa, o número de células picnóticas foi ainda maior, não se restringindo apenas a espermatócitos, mas também a espermatogônias (Figura 17). Também verificou-se a formação de vacúolos nos citoplasma e no núcleo de espermatogônias. Devido as técnicas utilizadas, não foi possível averiguar se esses vacúolos têm conteúdo e, em caso afirmativo, qual sua constituição (Figura 18).

Em relação as células de Sertoli, verificou-se o aumento da emissão de processos citoplasmáticos para fagocitose dos espermatozoides em 30 °C (Figura 19). A fagocitose dos espermatozoides pelas células de Sertoli na temperatura de 24 °C foi exclusiva nos indivíduos em maturação final 4, para a reabsorção dos espermatozoides residuais no lúmen dos túbulos, porém nos indivíduos mantidos a 30 °C a emissão de processos citoplasmáticos por essas células ocorreu em indivíduos em maturação final 2, 3 e 4.

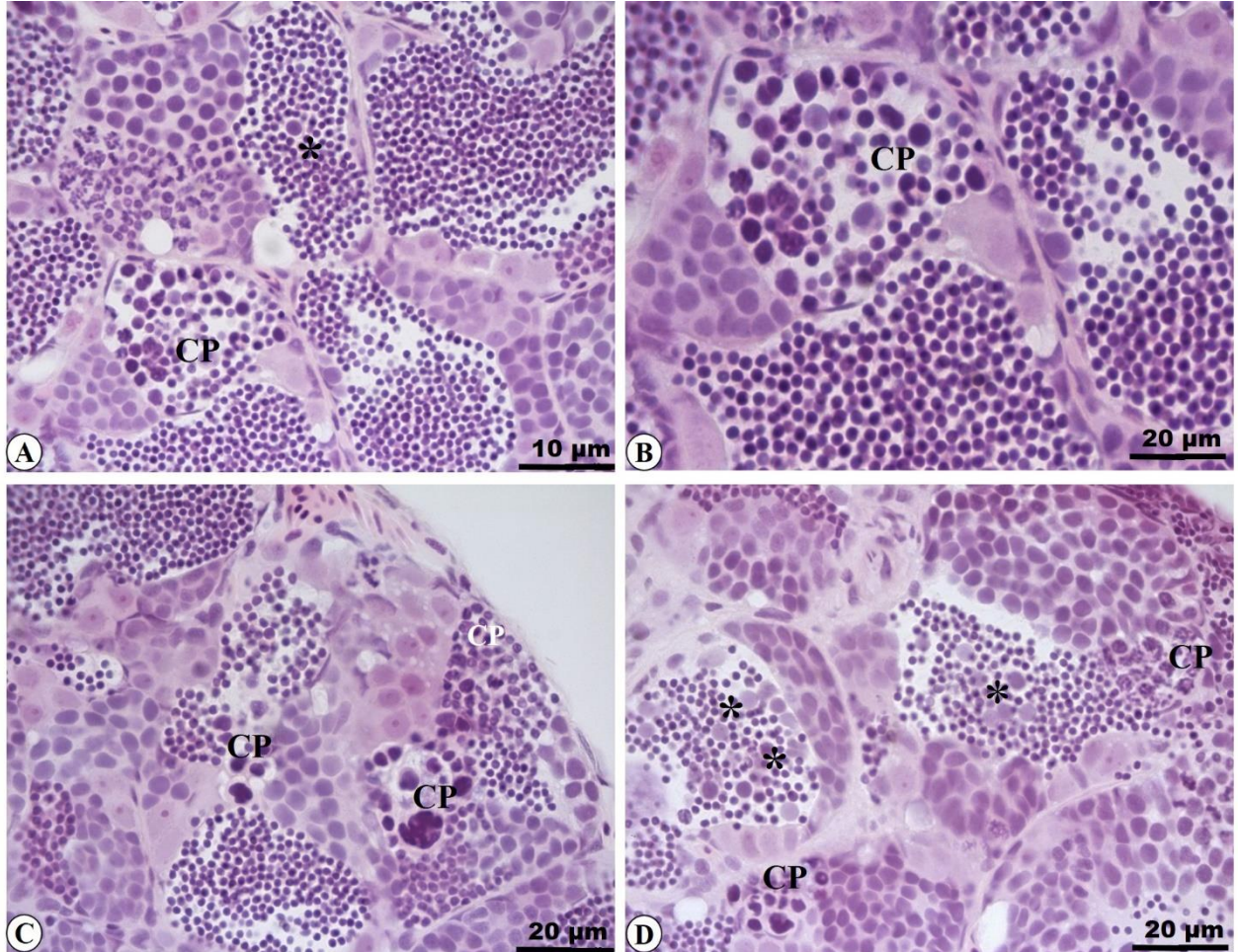
Além disso, foram encontrados outros tipos celulares no lúmen dos túbulos além dos espermatozoides, possivelmente macrófagos (Figura 17 e 20).

Figura 16 – Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - **A- D**: Testículos de *D. aequipinnatus* mantidos a 30°C. Porção do testículo com aspecto desorganizado, sem definição dos compartimentos germinativo e compartimento intersticial. Presença de filamentos (F) que podem ser fibrilas de colágeno e células mióides. **Coloração:** PAS Metanil Yellow e Hematoxilina Férrica.



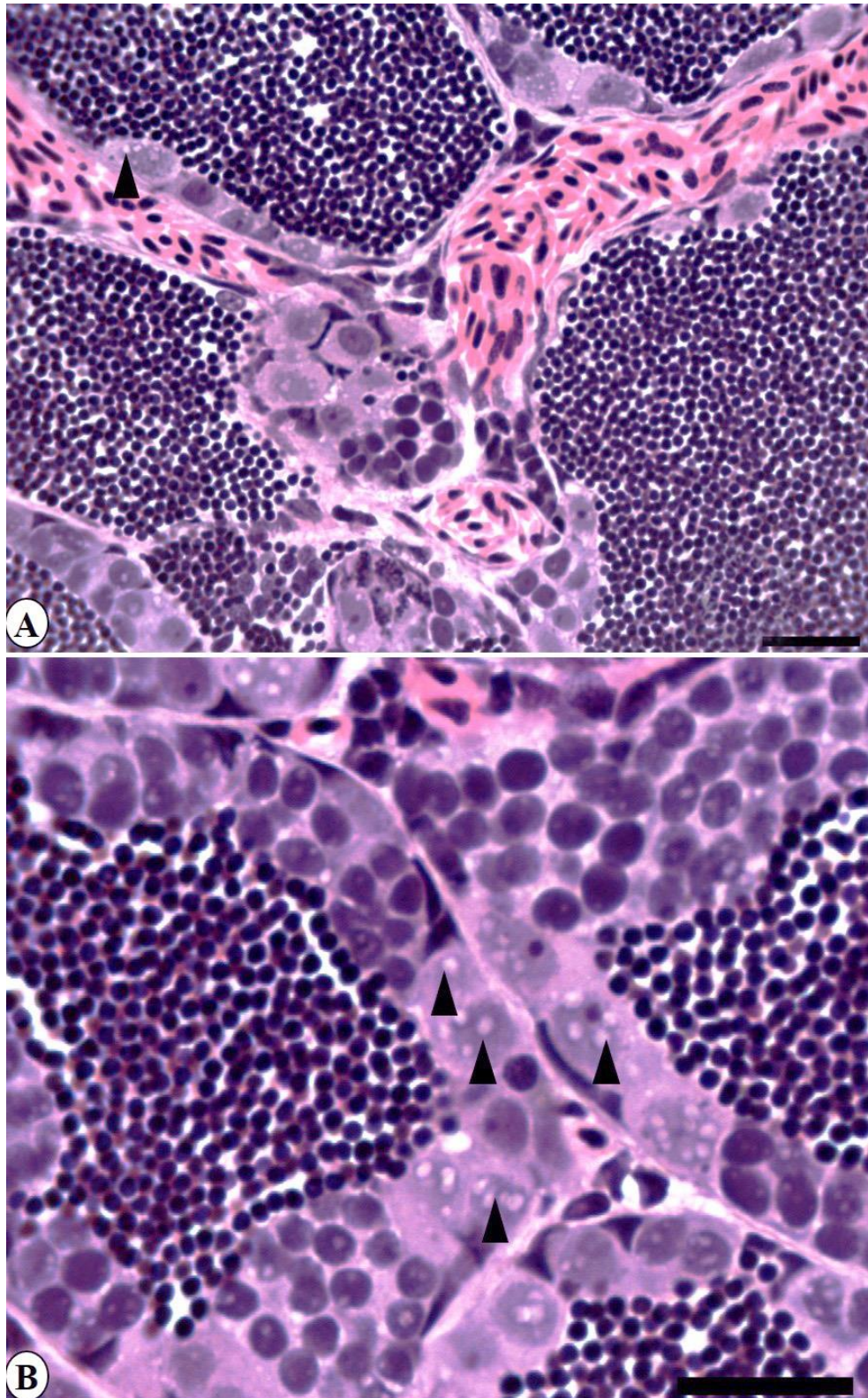
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 17 - Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Testículos de *D. aequipinnatus* mantidos a 30°C. **A, C e D:** Espermatocistos com células picnóticas (CP) e a presença de células diferentes no lúmen (*), possivelmente são macrófagos. **B:** Visão aumentada de A, com detalhe do cisto contendo espermátocitos em morte celular. **Coloração:** HE.



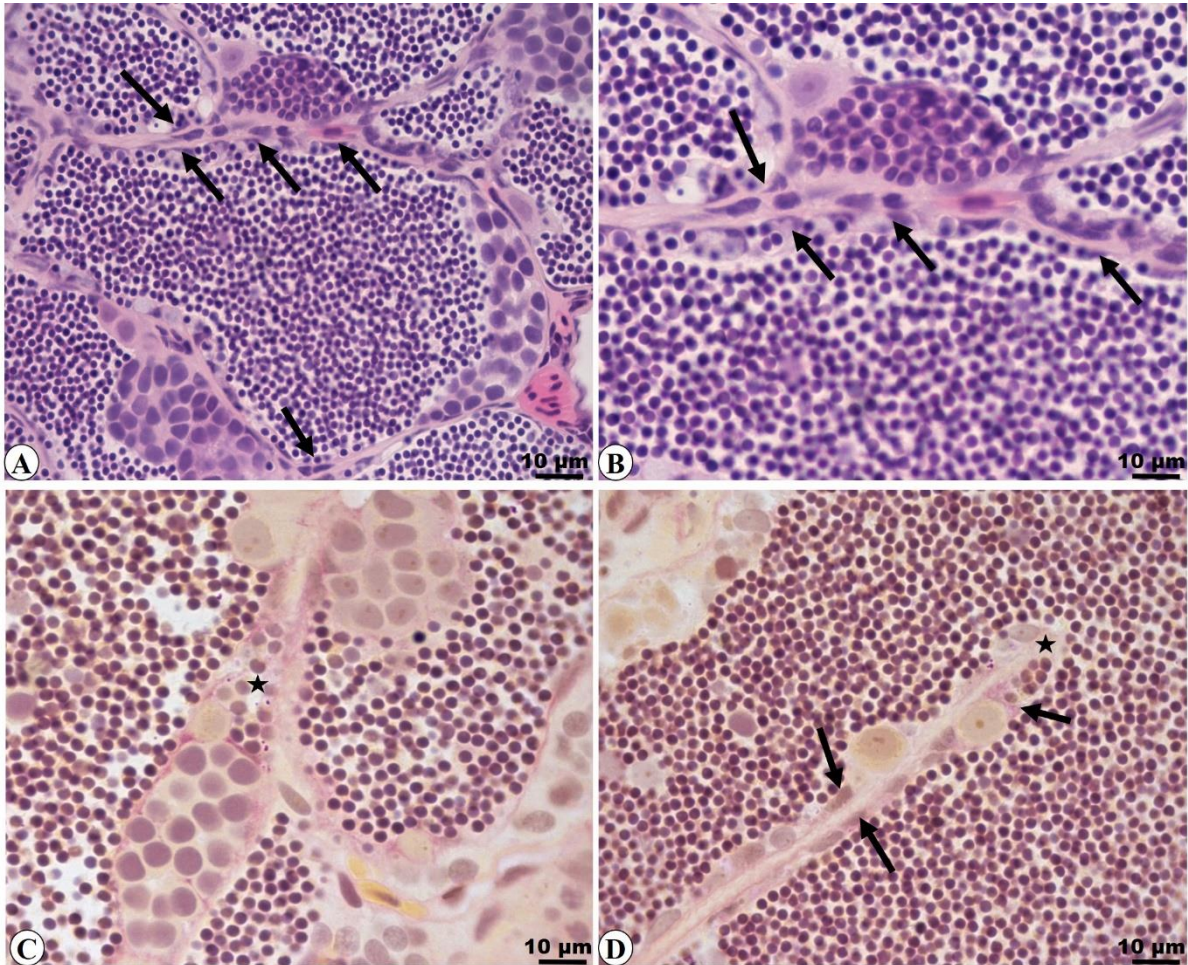
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 18 - Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Testículos de *D. aequipinnatus* mantidos a 18°C. **A-B:** Espermatogônias e espermatócitos apresentando vacúolos (cabeça de seta). **Coloração:** HE. Barra 20 µm.



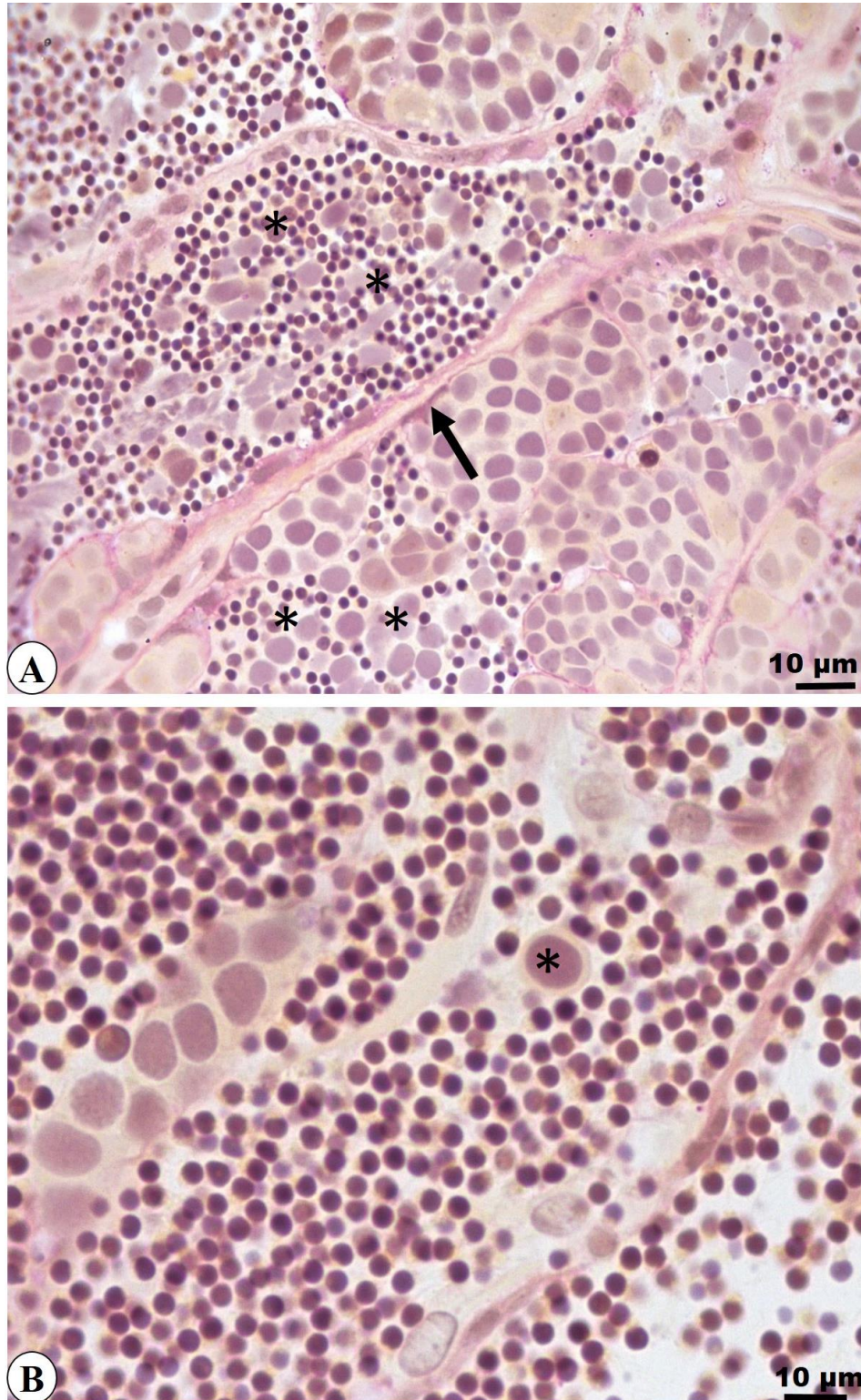
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 19 – Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Testículos de *D. aequipinnatus* mantidos a 30°C. **A – D:** Células de Sertoli (Seta) auxiliando na reabsorção de espermatozoides (estrela). **Coloração:** A-B: H.E, D-E: PAS Metanil Yellow e Hematoxilina Férrica.



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 20: Corte longitudinal do testículo de *Devario aequipinnatus* - Testículos de *D. aequipinnatus* mantidos a 30°C. **A - B:** Gônada com aparência desorganizada, sem delimitação entre os compartimentos intersticial e germinativo. Presença de outras células (*) no lúmen do testículo, além dos espermatozoides, que possivelmente são macrófagos. Seta vazada = Células de Sertoli. Seta = Espermatozoide. Coloração PAS Metanil Yellow e Hematoxilina.

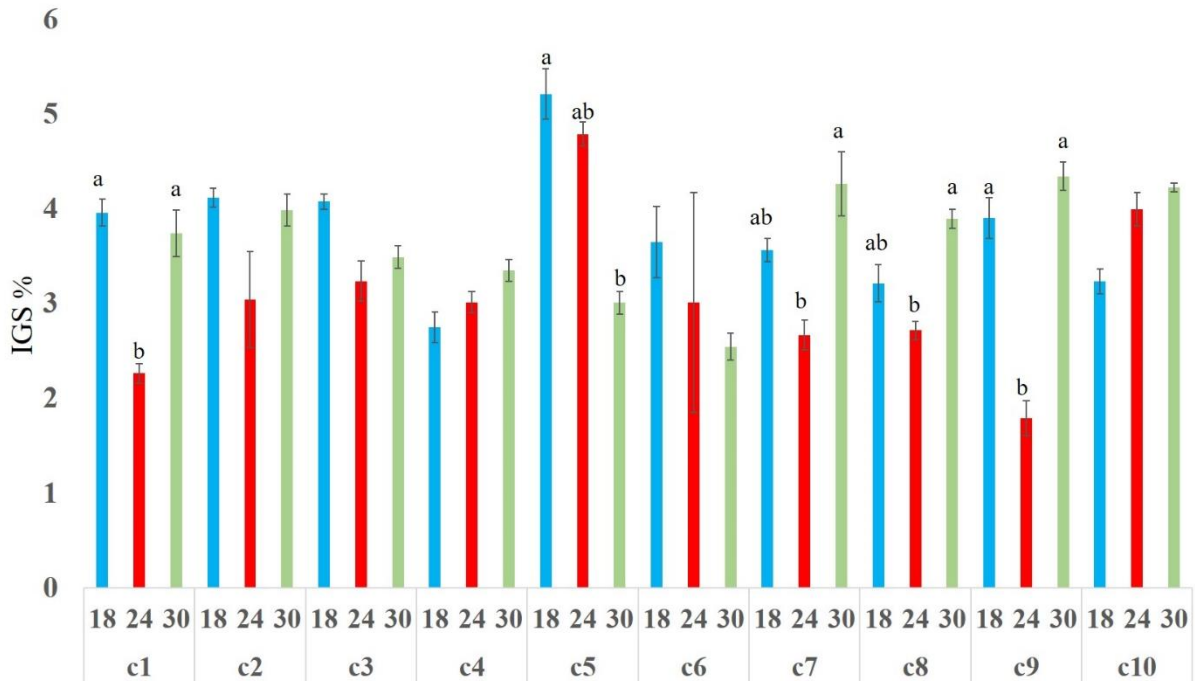


Fonte: Dados da pesquisa do autor.

3.5. ANÁLISE DO IGS

No comparativo do IGS nas três temperaturas ao longo das coletas, vemos que há diferença significativa entre os valores nas coletas 1, 5, 7, 8 e 9. Com exceção da coleta 5, nas demais coletas os valores nas temperaturas de 18 °C e 30 °C são iguais. Na coleta 5 ocorre uma diminuição do IGS em 30 °C e um aumento significativo do valor em 24 °C (Figura 21).

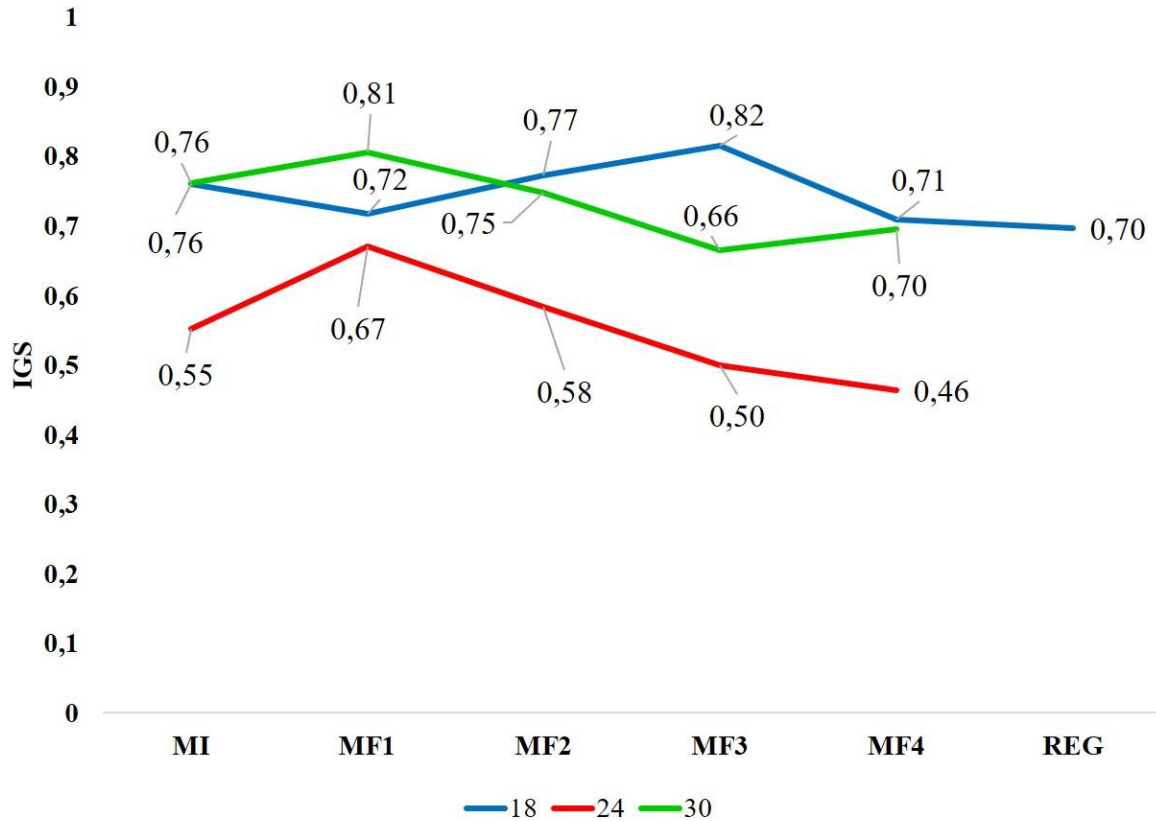
Figura 21 – Índice gonadossomático (IGS) de *Devario aequipinnatus* nas três temperaturas ao longo das dez coletas. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes (a, b, c) – Teste de Tukey ($p < 0,05$). **Abreviaturas:** C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; C3: Coleta 3; C4: Coleta 4; C5: Coleta 5; C6: Coleta 6; C7: Coleta 7; C8: Coleta 8; C9: Coleta 9; C10: Coleta 10; 18: Tratamento em 18 °C; 24: Tratamento em 24 °C; 30: Tratamento em 30 °C.



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Quando comparamos o IGS de acordo com as fases, temos que na temperatura controle (24 °C), o maior valor de IGS ocorre na fase de Maturação Final 1. O mesmo padrão de imagem ocorre em 30 °C, isto é, os maiores valores de IGS ocorrem em Maturação final 1, com um decréscimo até maturação final 4. Porém, os valores de IGS em 30 °C são mais altos do que em 24 °C. Em 18 °C há um padrão de distribuição diferente, há uma diminuição do IGS em maturação final 1, com posterior aumento, até o maior valor de IGS na temperatura (maturação final 3) e posterior diminuição (Figura 22).

Figura 22: Índice gonadosomático (IGS) relacionando as fases de maturação testicular em *Devario aequipinnatus* as diferentes temperaturas. **Abreviaturas:** 18: Tratamento em 18 °C; 24: Tratamento em 24 °C; 30: Tratamento em 30 °C; MI: Maturação Intermediária; MF1: Maturação Final 1; MF2: Maturação Final 3; MF4: Maturação Final 4; REG: Regressão.



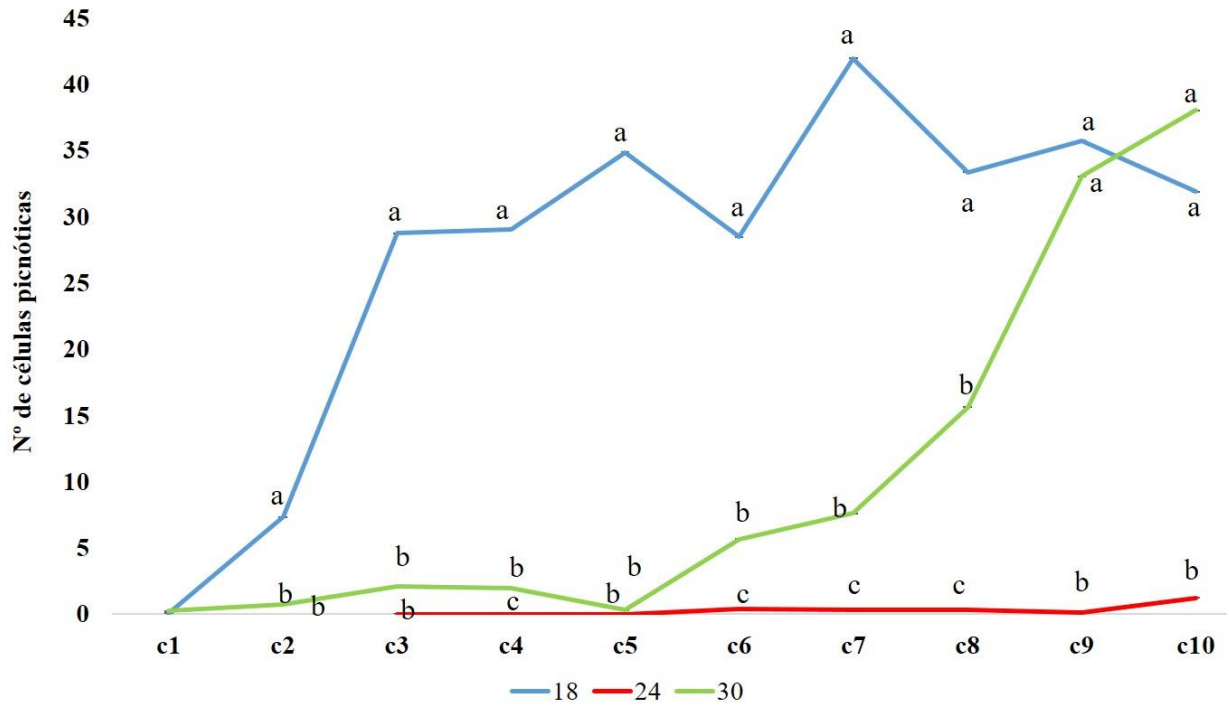
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

3.6. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

3.6.1. Células Picnóticas

Em relação as células picnóticas temos que, na temperatura controle o número de células picnóticas foi próximo a 0, com maior incidência na coleta 10. Em 18 °C a partir da coleta 2 os valores aumentaram significativamente, chegando no valor máximo na coleta 7; posteriormente, iniciou uma leve diminuição. Já em 30 °C, os valores foram iguais aos valores em 24 °C no início das coletas (exceto na coleta 4, onde houve diferença); a partir da coleta 6 os números de células picnóticas aumentaram, diferindo assim de 24 °C, até a coleta 9 onde os valores são mais altos e não há diferença estatística entre os valores encontrados em 30 °C e 18 °C (Figura 23).

Figura 23: Frequência de células picnóticas em *Devario aequipinnatus* nos tratamentos de 18 °C, 24 °C, 30 °C. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes (a, b, c) – Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). **Abreviaturas:** C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; C3: Coleta 3; C4: Coleta 4; C5: Coleta 5; C6: Coleta 6; C7: Coleta 7; C8: Coleta 8; C9: Coleta 9; C10: Coleta 10; 18: Tratamento em 18 °C; 24: Tratamento em 24 °C; 30: Tratamento em 30 °C.

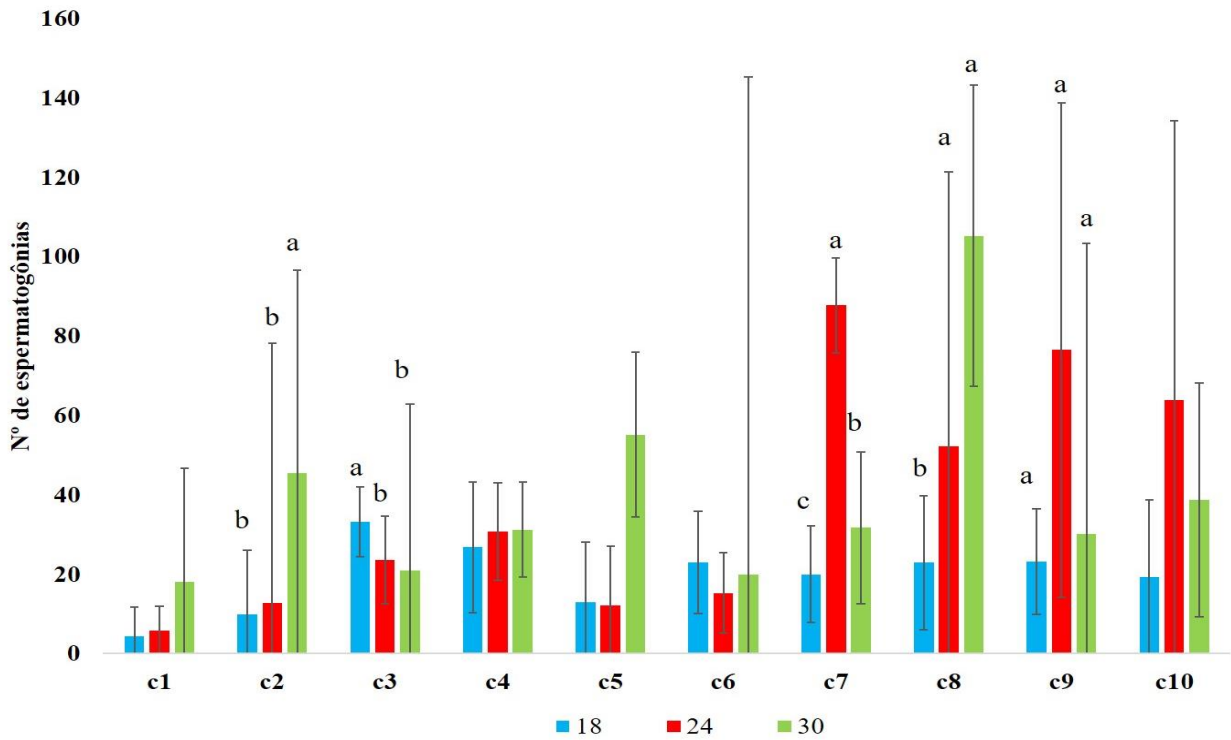


Fonte: Dados da pesquisa do autor.

3.6.2. Espermatogônias

Em relação ao número de espermatogônias, à 24 °C se manteve em valores baixos até a coleta 7, onde atingiu o maior valor. À 30 °C os valores nas coletas iniciais foram maiores do que em 30 °C, na coleta 8 alcançou seu maior número, com posterior diminuição na coleta 9. Já no caso dos animais mantidos à temperatura de 18 °C foram encontrados números significativamente menor de espermatogônias (Figura 24).

Figura 24: Frequência de espermatogônias em *Devario aequipinnatus* nos tratamentos de 18 °C, 24 °C, 30 °C. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes (a, b, c) – Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). **Abreviaturas:** C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; C3: Coleta 3; C4: Coleta 4; C5: Coleta 5; C6: Coleta 6; C7: Coleta 7; C8: Coleta 8; C9: Coleta 9; C10: Coleta 10; 18: Tratamento em 18 °C; 24: Tratamento em 24 °C; 30: Tratamento em 30 °C.

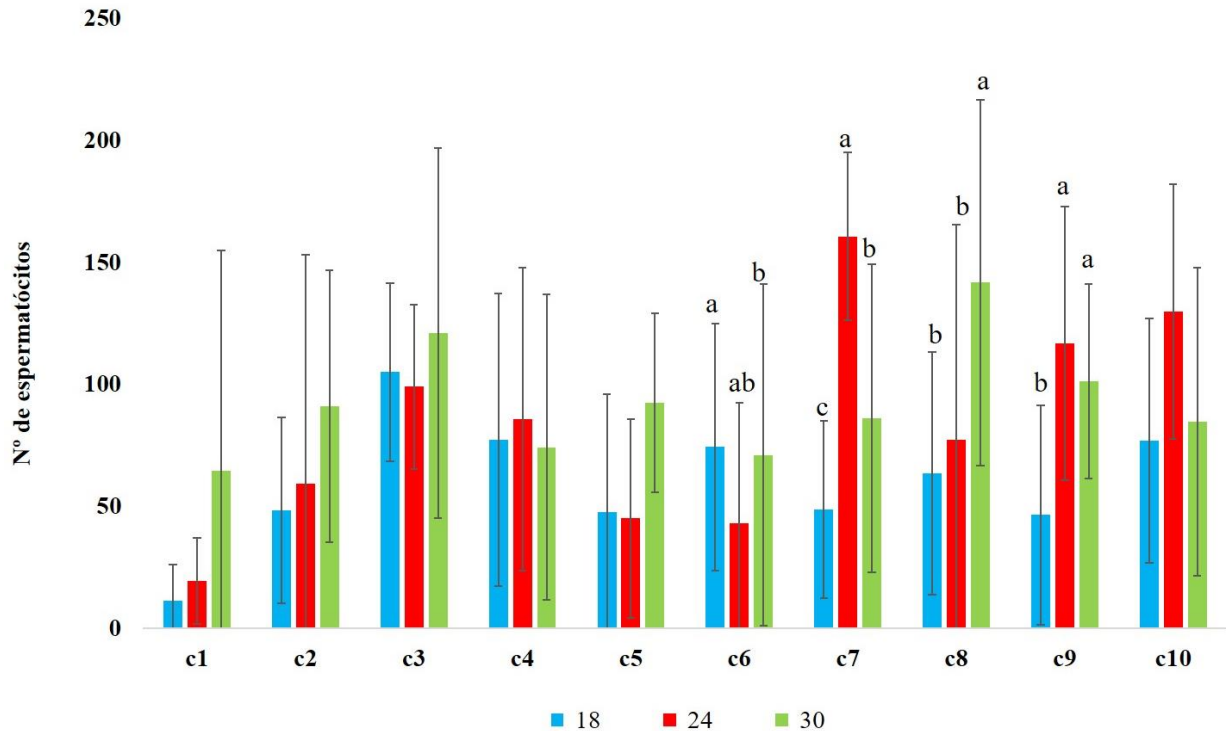


Fonte: Dados da pesquisa do autor.

3.6.3. Espermatócitos

O número de espermatócitos se manteve próximo nas três temperaturas até a coleta 6, onde nas temperaturas de 18 °C e 30 °C são maiores (respectivamente). Já na coleta 7, vemos um declínio nos valores em 18 °C e um aumento em 30 °C, mas é em 24 °C que vemos o maior número de espermatócitos. Os valores em 30 °C e 24 °C são iguais na coleta 8, e em 18 °C o valor é significativamente menor. No fim do experimento, não há diferença estatística entre os valores nas três temperaturas (Figura 25).

Figura 25: Frequência de espermatócitos em *Devario aequipinnatus* nos tratamentos de 18 °C, 24 °C, 30 °C. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes (a, b, c) – Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). **Abreviaturas:** C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; C3: Coleta 3; C4: Coleta 4; C5: Coleta 5; C6: Coleta 6; C7: Coleta 7; C8: Coleta 8; C9: Coleta 9; C10: Coleta 10; 18: Tratamento em 18 °C; 24: Tratamento em 24 °C; 30: Tratamento em 30 °C.

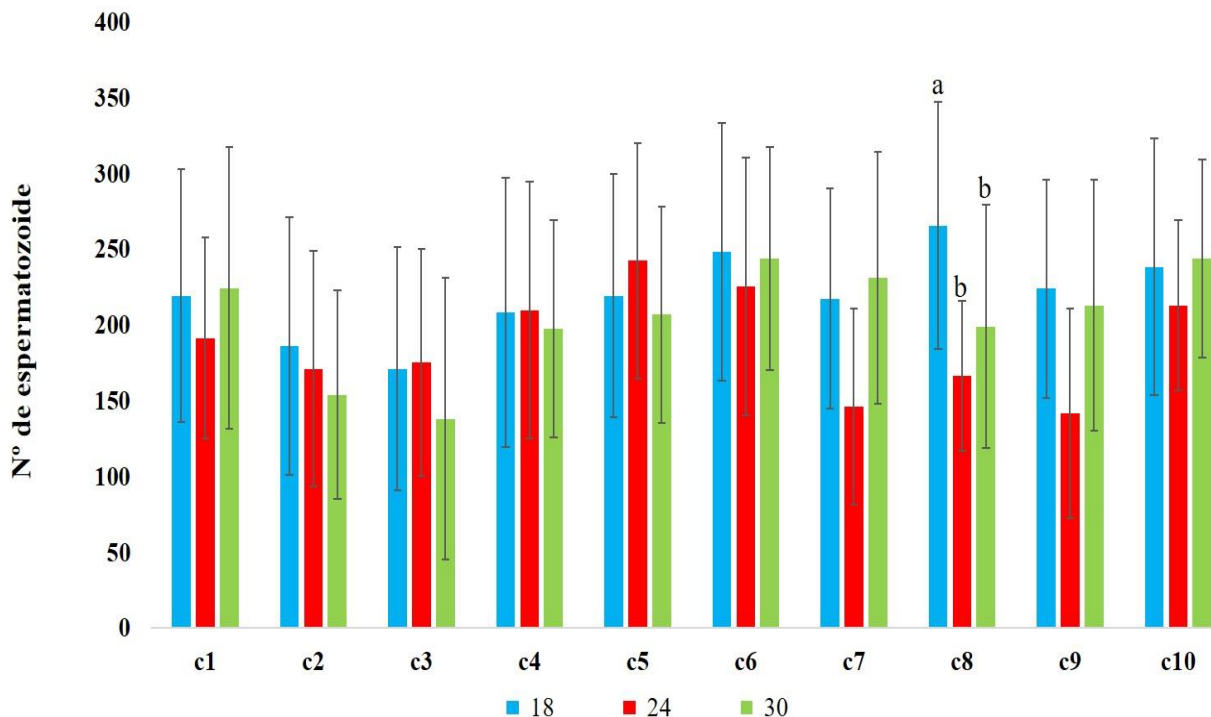


Fonte: Dados da pesquisa do autor.

3.6.4. Espermatozoides

Os valores nas três temperaturas foram estatisticamente iguais, exceto na coleta 8, onde os indivíduos mantidos a 18 °C apresentaram um maior número de espermatozoides. Embora não haja diferença significativa entre os valores, podemos verificar linhas de tendências, onde em 24 °C no início os valores são maiores e há uma tendência diminuição. Já em 18 °C e 30 °C há uma tendência ao crescimento, diferindo do controle (Figura 26).

Figura 26: Frequência de espermatozoides em *Devario aequipinnatus* nos tratamentos de 18 °C, 24 °C, 30 °C. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes (a, b) – Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). **Abreviaturas:** C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; C3: Coleta 3; C4: Coleta 4; C5: Coleta 5; C6: Coleta 6; C7: Coleta 7; C8: Coleta 8; C9: Coleta 9; C10: Coleta 10; 18: Tratamento em 18 °C; 24: Tratamento em 24 °C; 30: Tratamento em 30 °C.

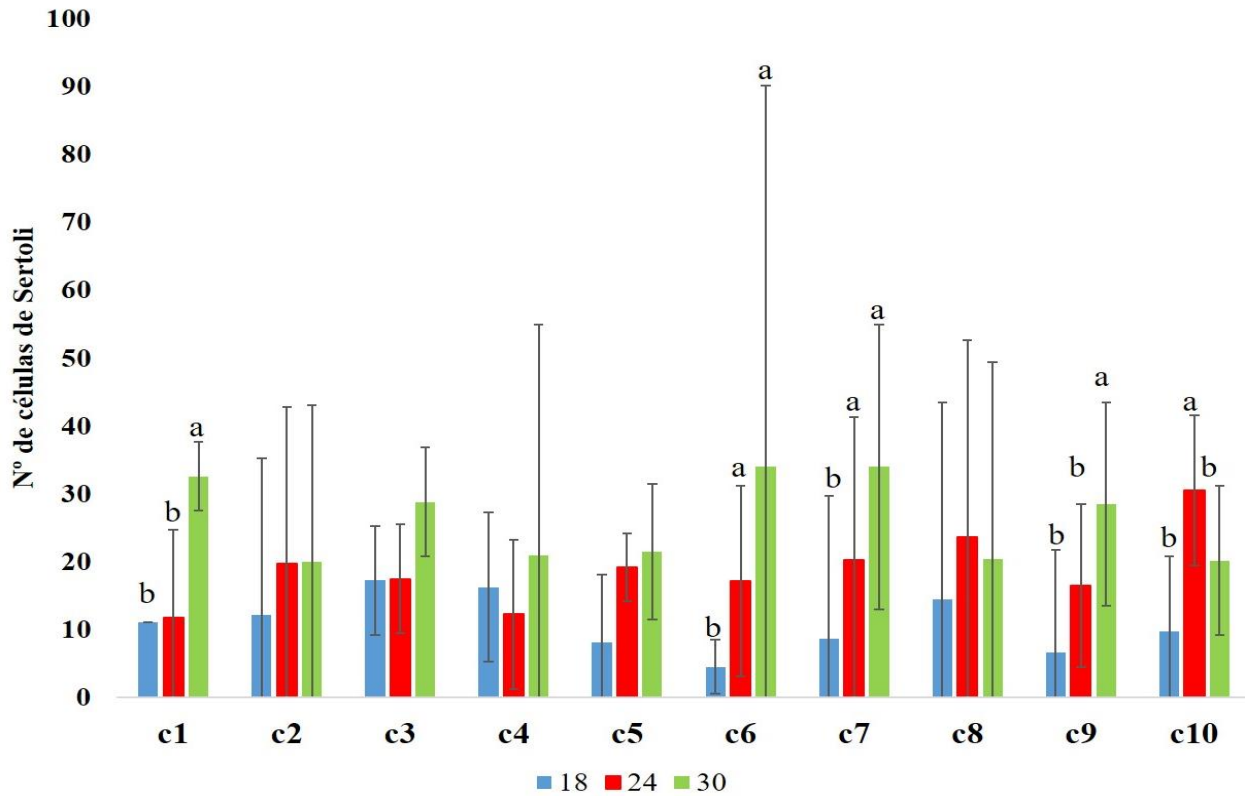


Fonte: Dados da pesquisa do autor.

3.6.5. Células de Sertoli

O observado para o número de células de Sertoli na temperatura controle é uma tendência ao crescimento. Houveram diferenças estatística somente nas coletas 1, 6, 7, 9 e 10. Na temperatura de 30 °C os valores são maiores nas coletas iniciais, porém na coleta 6 e 7, não há diferença entre os valores de 30 °C e na temperatura controle; houve uma tendência a diminuição e na coleta 10 os valores em 30 °C são menores estatisticamente que em 24 °C. Nos indivíduos submetidos a temperaturas baixas, os valores iniciais se assemelham aos encontrados em 24 °C, porém, a tendência é de uma diminuição constante, sendo estes os menores valores dentre as coletas. Diante disso, o número de células de Sertoli nas temperaturas de 30 °C e 18 °C se diferiram em relação ao controle. Em 18 °C houve um número menor de células e em 30 °C embora os valores fossem maiores no início, esse valor decresceu, e o experimento terminou com números menores do que em 24 °C (Figura 27).

Figura 27: Frequência de células de Sertoli em *Devario aequipinnatus* nos tratamentos de 18 °C, 24 °C, 30 °C. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes (a, b, c) – Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). **Abreviaturas:** C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; C3: Coleta 3; C4: Coleta 4; C5: Coleta 5; C6: Coleta 6; C7: Coleta 7; C8: Coleta 8; C9: Coleta 9; C10: Coleta 10; 18: Tratamento em 18 °C; 24: Tratamento em 24 °C; 30: Tratamento em 30 °C.

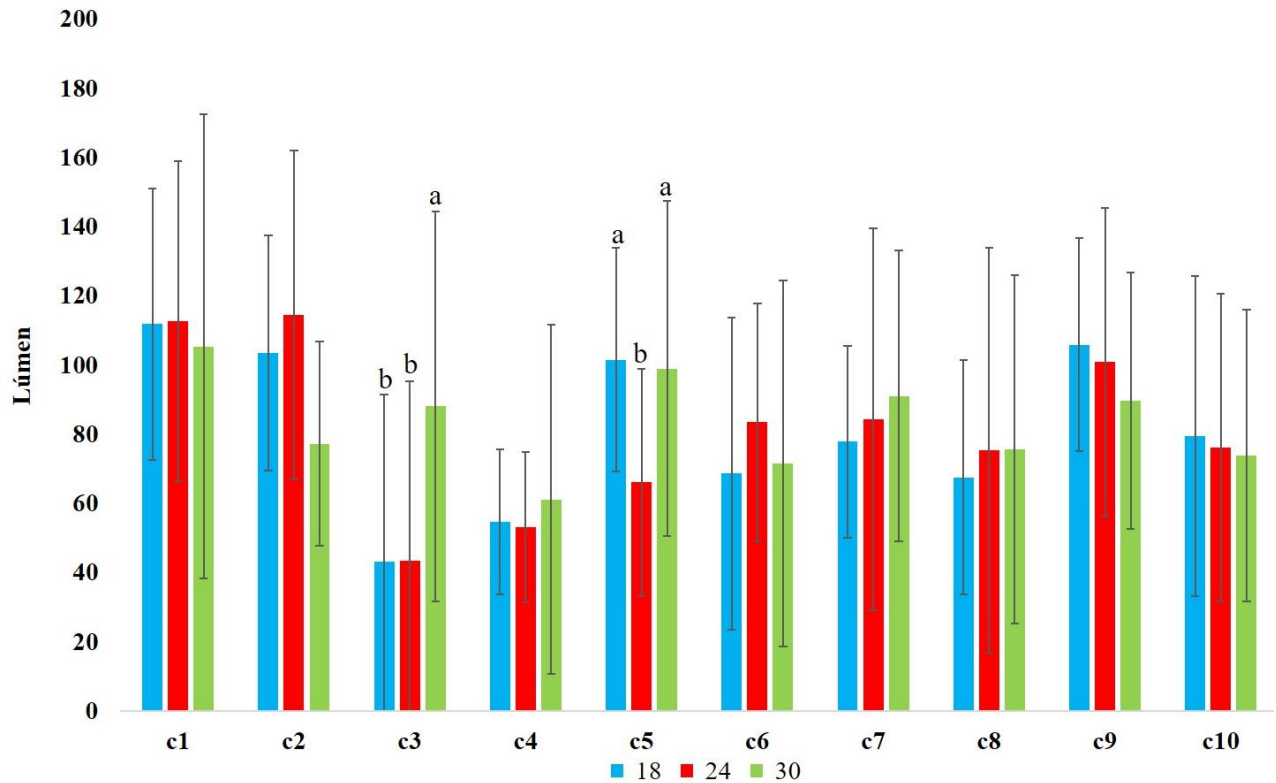


Fonte: Dados da pesquisa do autor.

3.6.6. Lúmen

Os valores nas três temperaturas foram estatisticamente iguais, exceto nas coletas 4 e 5 onde em 30 °C encontrou-se maiores valores (coleta 4) e valor estatisticamente iguais a 18 °C (coleta 5). Para ambas as temperaturas o padrão de tendência foi o mesmo, maiores valores nas coletas iniciais, com posterior decréscimo (Figura 28).

Figura 28: Frequência de lúmen em *Devario aequipinnatus* nos tratamentos de 18 °C, 24 °C, 30 °C. As diferenças significativas são representadas por letras diferentes (a, b, c) – C3: Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$), C5: Teste de Tukey ($p < 0,05$). **Abreviaturas:** C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; C3: Coleta 3; C4: Coleta 4; C5: Coleta 5; C6: Coleta 6; C7: Coleta 7; C8: Coleta 8; C9: Coleta 9; C10: Coleta 10; 18: Tratamento em 18 °C; 24: Tratamento em 24 °C; 30: Tratamento em 30 °C.

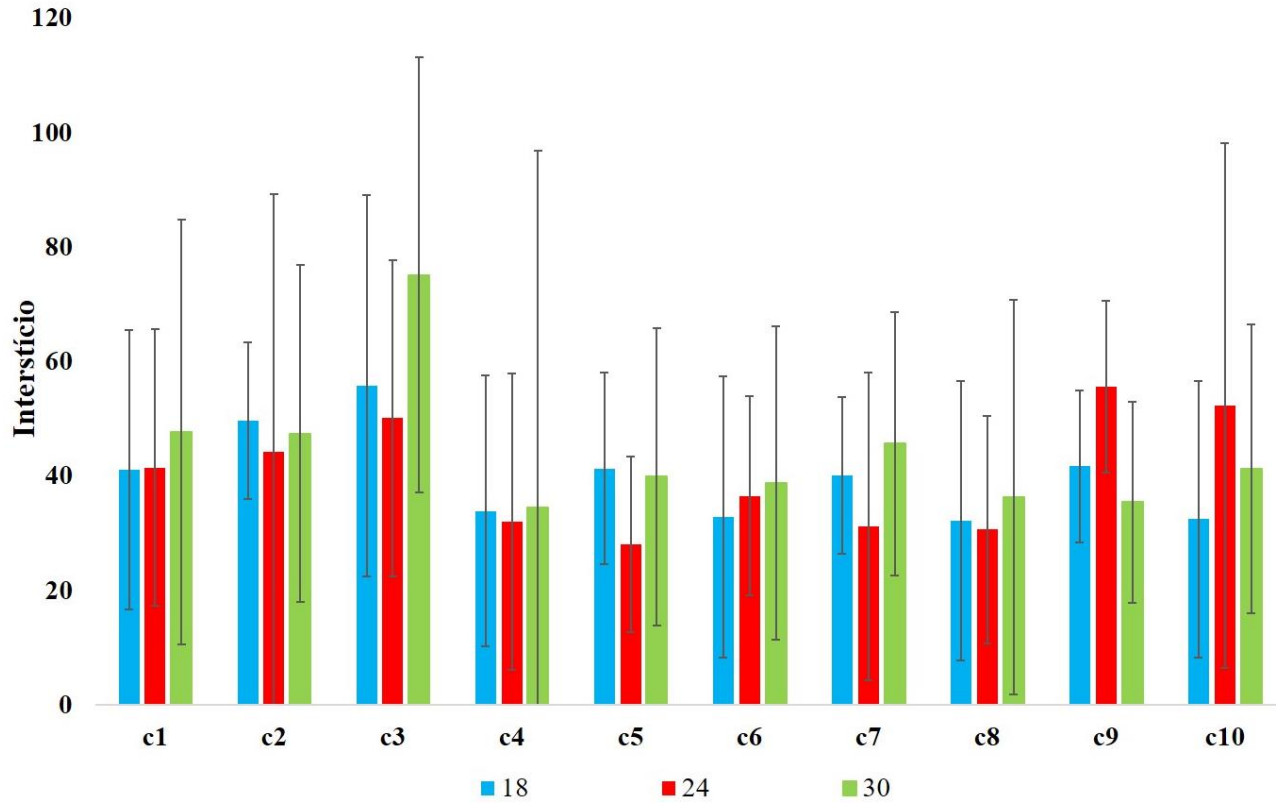


Fonte: Dados da pesquisa do autor

3.6.7. Interstício

Os valores nas três temperaturas foram estatisticamente iguais. Embora não haja diferença significativa entre os valores, podemos verificar linhas de tendências, onde em 24 °C, no início os valores são menores e há uma tendência ao aumento. Já em 18 °C e 30 °C há uma tendência ao declínio, diferindo do controle (Figura 29).

Figura 29: Frequência de células de Sertoli em *Devario aequipinnatus* nos tratamentos de 18 °C, 24 °C, 30 °C. Foi realizado o Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$), porém não houve diferença significativa entre os valores. **Abreviaturas:** C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; C3: Coleta 3; C4: Coleta 4; C5: Coleta 5; C6: Coleta 6; C7: Coleta 7; C8: Coleta 8; C9: Coleta 9; C10: Coleta 10; 18: Tratamento em 18 °C; 24: Tratamento em 24 °C; 30: Tratamento em 30 °C.



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

4. DISCUSSÃO

A espermatogênese de *D. aequipinnatus* ocorre dentro de cistos, com o desenvolvimento sincrônico das células, bem como ocorre na maioria dos anamniotas (peixes e anfíbios) (NOBREGA et al., 2009; SCHULZ et al., 2010). Porém algumas espécies apresentam um desenvolvimento parcialmente sincrônico, como encontrado em *Sorubim lima* (QUAGIO- GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999) e *Cichla kelberi* (SIQUEIRA-SILVA, 2013), no qual o desenvolvimento dos espermátócitos primários, dentro do mesmo cisto, ocorre com uma sutil assincronia. Diferente do que acontece em mamíferos, onde as espermatogônias primárias estão em contato direto com a lâmina basal, em peixes as espermatogônias primárias são envolvidas pelas células de Sertoli (SCHULZ et al., 2010).

Assim como na maioria dos táxons existentes, a distribuição das espermatogônias em *D. aequipinnatus* o caracterizam como do tipo espermatogonial irrestrito (GRIER et al., 1980; GRIER, 1993; GRIER; ARANZABAL, 2009).

Leal et al. (2009) definiram a espermatogênese com ênfase nas gerações espermatogoniais de *Danio rerio* de acordo com características morfológicas das espermatogônias, como tamanho das células, condensação da cromatina, presença e quantidade de nucléolos, características do envelope nuclear e quantidade de espermatogônias por cistos. Pertencente à mesma família Cyprinidae, *Devario aequipinnatus* apresentam quatro gerações espermatogoniais com características semelhantes ao *Danio rerio*, espermatogônia do tipo A indiferenciada (*), do tipo A indiferenciada, do tipo A diferenciada e do tipo B (LEAL et al., 2009).

As fases de maturação gonadal encontradas em *D. aequipinnatus* foram definidas com base nas alterações no epitélio germinativo e nos estágios de desenvolvimento das células espermatogênicas descrito por Grier (2002), sendo, fase de Maturação Intermediária, Maturação Final. Devido as muitas alterações no epitélio testicular dentro da fase Maturação Final, optou-se pela divisão desta em quatro fases: Maturação Final 1, Maturação Final 2, Maturação Final 3 e Maturação Final 4. Não foram encontrados indivíduos em Maturação Inicial neste experimento, porém, Chagas, (2015) descreveu o ciclo de *D. aequipinnatus* no qual encontra todas as fases do ciclo gonadal baseado em Grier; Taylor, (1998).

O estudo sobre a duração da espermatogênese em zebrafish (*D. rerio*) mostrou que em 5 dias é possível encontrar espermatozoides no lúmen dos túbulos, provenientes de uma espermatogônia previamente marcada com BrdU (LEAL et al., 2009). Sendo assim, por pertencerem à mesma família, e apresentarem características morfológicas e gonadais

semelhantes, é possível que a fase de Maturação Inicial em *D. aequipinnatus* ocorra rapidamente, e que o intervalo do experimento (a cada 4 dias) não tenha sido suficiente para amostrar indivíduos nesta fase. O contrário pode ter ocorrido com a fase de Regressão, encontrada somente em indivíduos mantidos a 18 °C. Devido à temperatura baixa, todo o desenvolvimento gonadal tenha desacelerado, e então amostrado. A fase de Regressão é caracterizada pela presença de espermatozoides residuais no lúmen testicular, das células de Sertoli auxiliando no processo de reestruturação da gonadal, por meio da fagocitose desses corpos residuais provenientes do ciclo anterior e de uma intensa proliferação de espermatogônias. A classe regredida, caracterizada somente pela presença de espermatogônias (primárias ou secundárias) no epitélio germinativo (GRIER, 2002), não foi observado nos indivíduos estudados; esta fase denominada de fase preparatória por Verissimo-Silveira (2003), ocorre juntamente com a Regressão.

Em relação ao ciclo gonadal ao longo do experimento, observou-se que os peixes mantidos a 30°C tiveram uma aceleração da espermatogênese assim como ocorreu em tilápias (VILELA et al, 2003); no entanto, a partir do 20º dia de experimentação alguns indivíduos apresentaram grandes alterações na morfologia testicular. Partes da gônada apresentam aspecto desorganizado, sem delimitação de interstício e epitélio germinativo, o que interrompeu a espermatogênese na região.

Efeitos nocivos a espermatogênese e performance reprodutiva tem sido demonstrados na literatura devido a altas temperaturas (ALVARENGA; FRANÇA, 2009; DONELSON, et al., 2010; ITO; YAMASHITA; STRÜSSMANN, 2003; LACERDA et. al., 2010; 2013; MAJHI, et. al, 2009). Em *Astyanax altiparanae* (SIQUEIRA-SILVA, 2015), *Oreochromis niloticus* (LACERDA, 2006) mantidos em águas quentes (35°), ocorreu a supressão da espermatogênese endógena. Nesses casos, concluíram que associando altas temperaturas ao uso de quimioterápicos o resultado é mais eficiente, ocorrendo a supressão é ainda mais eficiente. Em juvenis de *Patagonina hatcheri* mantidos a 27 °C ocorre a diminuição de células germinativas; em *Odontesthes bonariensis* e *P. hatcheri* transferidos para águas quentes (de 17 °C para 29 °C) tiveram as células germinativas deplecionadas (STRÜSSMANN; SAITO; TAKASHIMA, 1998). Ito, Yamashita, Strüssmann, (2003), estudaram as larvas de Pejerrey mantidas a 29 °C, e observaram células germinativas anormais a partir da primeira semana de experimento, até que a partir da 8ª semana a maioria das células germinativas encontradas estavam anormais.

Em *D. aequipinnatus* as alterações morfológicas não se restringiram aos animais mantidos a altas temperaturas. Sob 18 °C verificou-se também a presença de vacúolos no

citoplasma e núcleo de espermatogônias. Porém, com a metodologia aplicada não foi possível inferir a constituição das mesmas.

Em *D. aequipinnatus* as células picnóticas foram encontradas como células isoladas ou em grupo, espermatogônias ou espermatocistos, o que está de acordo com o descrito na literatura (ITO et al., 2008). Os maiores valores foram observadas em indivíduos mantidos 18 °C. O mesmo foi descrito para tilápias (*Oreochromis niloticus*) no qual a porcentagem de apoptose de células germinativas foi superior em indivíduos mantidos a 20 °C, comparado aos animais mantidos em temperaturas mais elevadas (ALVARENGA; FRANÇA, 2009). No entanto, vemos que no final deste experimento, os valores de células picnóticas em 18 °C e 30 °C se igualam estatisticamente; então a espermatogênese em *D. aequipinnatus* é inicialmente mais sensível a temperaturas baixas, mas a exposição contínua a altas temperaturas apresenta resultado tão nocivo quanto em temperaturas baixas. Em *O. bonariensis* submetidos a exposição contínua a 29 °C apresentaram crescimento gradual no número de células apoptóticas em comparação aos animais submetidos a exposição rápida (36 horas) a 31 °C, porém os maiores valores foram encontrados em 29 °C. A exemplo do *O. bonariensis*, se o experimento se prolongasse poderíamos observar a temperatura de 30 °C com influência ainda maior no número de células picnóticas.

Os valores de IGS apresentaram diferença estatística em apenas 5 coletas, porém, podemos inferir que o IGS nas temperaturas 18 °C e 30 °C foram maiores do que na temperatura controle. No comparativo de acordo com as fases, na temperatura controle o maior valor ocorreu em maturação final 1, isso se deve ao fato de que nessa fase há intensa proliferação celular e grande quantidade de cisto de espermatócitos na gônada. Além disso, com o início da liberação dos espermatozoides para a luz nas periferias, inicia a liberação dos fluidos seminais.

A exposição dos animais aos tratamentos pode ter influenciado no número de espermatogônias, fazendo com que houvesse uma diminuição em 18 °C e uma produção maior em 30 °. Por isso, observa-se que a temperatura de 18 °C influenciou negativamente no número de espermatogônias, comparados ao controle. O mesmo padrão ocorre para espermatócitos. Isso porque a temperatura de 18 °C resultou em grande quantidade de células picnóticas, que eram em sua maioria, espermatogônias e espermatócitos.

Em *D. aequipinnatus* ficou evidente a fagocitose pelas células de Sertoli. As células de Sertoli tem função de envolver e nutrir as espermatogônias primárias, e todas as células originadas a partir das divisões e diferenciação da espermatogônia dentro do cisto (BILLARD, 1970; (BATLOUNI; NÓBREGA; FRANÇA, 2009; SCHULZ et al., 2010;

URIBE; GRIER; MEJÍA-ROA, 2014; SIQUEIRA-SILVA et al., 2015), mas também, são observadas realizando fagocitose de corpos residuais, células picnóticas e de citoplasma residual ao longo da formação dos espermatozoides (BILLARD, 1970). Neste estudo, os maiores valores de células de Sertoli foram encontrados em indivíduos mantidos a 30°C, isso pode estar relacionado a degradação de partes das gônadas que foram lesionadas pela temperatura, necessitando de um maior aporte de células de Sertoli para a reestruturação da gônada e fagocitose das células picnóticas resultantes do tratamento.

A quantidade mensurada de lúmen vazio nas três temperaturas não apresenta diferença significativa e, o mesmo ocorre para o número de espermatozoides. Entretanto, se o número de espermatogônias e espermatócitos é menor em 18°C, é provável que grande parte dos espermatozoides sejam residuais, que ainda não foram reabsorvidos. É importante ressaltar que, embora haja a mesma quantidade de espermatozoides no lúmen na temperatura controle e nos tratamentos, não é possível afirmar a integridade e viabilidade desses espermatozoides para fecundarem os oócitos no momento da reprodução.

Foram observadas células diferentes de espermatozoides no lúmen tubular nos tratamentos de 18 °C e 30 °C, que provavelmente são macrófagos. Em tilápias foram encontrados células imunes, macrófagos e mastócitos em particular, no compartimento intratubular e também no compartimento tubular, em animais mantidos em temperaturas baixas (ALVARENGA; FRANÇA, 2009).

5. CONCLUSÃO

As fases de maturação gonadal encontradas neste estudo foram Maturação Intermediária, Maturação Final - dividida em Maturação Final 1, Maturação Final 2, Maturação Final 3 e Maturação Final 4 – e Regressão. A fase de Regressão foi encontrada somente em 18 °C e sua principal característica é a reabsorção dos corpos residuais ocorrendo juntamente com a proliferação de espermatogônias.

Podemos concluir que as temperaturas influenciaram severamente na espermatogênese de *D. aequipinnatus*. A temperatura de 30 °C proporcionou uma aceleração no ciclo reprodutivo, e 18 °C um ciclo reprodutivo mais longo, comparados ao controle, porém, não estão correlacionadas com alterações nos valores de IGS. Os maiores valores de IGS em 24 °C e 30 °C foram em Maturação Final 1, já em 18 °C o maior valor foi em maturação final 3.

Embora haja uma aceleração da espermatogênese em 30 °C, há danos severos causados pelas temperaturas (18 °C e 30 °C) evidenciado pela desorganização da gônada e presença de mio-fibroblastos, proveniente da degradação do testículo. Além disso, é possível inferir que as temperaturas influenciaram no aumento do número de células picnóticas, e mesmo que as células sofram mais rapidamente à 18 °C, os valores se igualam no fim do experimento, denotando que 30 °C tem efeitos nocivos tão rigorosos quanto 18 °C.

Há um maior número de espermatogônias nos indivíduos mantidos a 30 °C, porém não é sabido a viabilidade dessas células em dar continuidade a espermatogênese. O mesmo ocorre com o número de espermatozoides, que embora não apresente diferença significativa entre as temperaturas, não é possível afirmar a qualidade e capacidade de fecundação dos espermatozoides.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, E. R. DE; FRANÇA, L. R. DE. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 80, n. 3, p. 537–544, nov. 2009.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 2. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009.
- BATLOUNI, S. R.; NÓBREGA, R. H.; FRANÇA, L. R. Cell junctions in fish seminiferous epithelium. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 207–217, 2009.
- BILLARD R. 1970 La spermatogênese de *Pecilia reticulata*. IV. La espermiogênese. Etude ultrastructurale. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys**, Amsterdam, v. 10, p. 493-510.
- CHAGAS, J. M. A. **Os efeitos da alta temperatura e do Mylerab (Bulsufan) na espermatogênese de *Devario aequipinnatus* (Teleostei, Cyprinidae)**. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2015.
- DONELSON, J. M.; MUNDAY, P. L.; McCORMICK, N. M.; PANKHURST, N. W.; PANKHURST, P. M. Effects of elevated water temperature and food availability on the reproductive performance of a coral reef fish. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, v. 401, p. 233-243, 2010.
- GIENAPP, P.; TEPLITSKY, C.; ALHO, J. S.; MILLS, J. A.; MERILÄ, J. Climate change and evolution: Disentangling environmental and genetic responses. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 167–178, 2008.
- GRIER, H.J.; LINTON, J. R.; LEATHERLAND, J. F.; VLAMING, V. L. Structural evidence for two different testicular types in Teleost fishes. **The American Journal of Anatomy**, Hoboken, v. 59, n. 3, p. 331-345, nov. 1980.
- GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cells barrier. In: RUSSELL, L. D; GRISWORLD, M. D. (Ed.) **The Sertoli cell**. Clearwater: Cache River, 1993. p. 704-739.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, London, v. 53, p. 521–542, 1998.

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. **Institute of Marine Sciences**, Flórida, v. 53, p. 537-552, 2002.

GRIER, H. J.; ARANZABAL, M. C. U. The testis and spermatogenesis in teleost. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)**. Enfield: Science, 2009. v. 8. p. 119-142.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285 p.

ITO, L. S.; TAKAHASHI, C.; YAMASHITA, M.; Warm Water Induces Apoptosis, Gonadal Degeneration, and Germ Cell Loss in Subadult Pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes). **Physiological and Biochemical Zoology**, Chicago, v. 81, n. 6, p. 762–774, 2008.

ITO, L. S.; YAMASHITA, M.; STRÜSSMANN, C. A. Histological process and dynamics of germ cell degeneration in pejerrey *Odontesthes bonariensis* larvae and juveniles during exposure to warm water. **Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology**, Hoboken, v. 297, n. 2, p. 169–179, 2003.

LACERDA, S. M. S. N. **Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental**. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

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

NOBREGA, 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 Biochemical**, Hoboken, v. 35, p. 197-206, 2009.

MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; RAHMAN, S. K. M.; SUZUKI, T.; STRUSSMANN, C. A. Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, n. 7, p. 1162–1172, 2009.

PAUL, B.; FARUQUE, M. D. H.; AHSAN, A. D. Consequences of climate change on fish biodiversity in the River Turag, Bangladesh: a community perception study. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, Dubai, v. 6, n. 2, p. 136-141, 2014.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; CARVALHO, E. D. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. **Tissue & Cell**, London, v. 31, n. 6, p. 561–567, 1999.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 459-462.

SCHULZ, R. W. et al. Spermatogenesis in fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390–411, 2010.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; VICENTINI, C. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Reproductive cycle of the neotropical cichlid yellow peacock bass *Cichla kelberi*: a novel pattern of testicular development. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 587-596, 2013.

SIQUEIRA-SILVA, D. H. et al. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 84, n. 6, p. 1033–1042, 2015.

STRÜSSMANN, C. A.; SAITO, T.; TAKASHIMA, F. Heat-induced Germ Cell Deficiency in the Teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Philadelphia v. 119, n. 2, p. 637–644, 1998.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Ed. da UEM, 1996.

URIBE, M. C.; GRIER, H. J.; MEJÍA-ROA, V. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. **Spermatogenesis**, Philadelphia, v. 4, n. 3, p. e983400, 2014.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do Dourado (*Salminus maxillosus* Valenciennes. 1849. 60 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Jaboticabal, 2003.**

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**, Dordrecht, v. 28, n. 1-4, p. 187–190, 2003.