



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

IBB - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Análise estereológica da espermatogênese em
Brycon orbignyanus (Characiformes: Bryconidae)

Cristiane Fernanda Benevente

Botucatu – SP

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
IBB - INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Análise estereológica da espermatogênese em
Brycon orbignyanus (Characiformes: Bryconidae)

Mestranda: Cristiane Fernanda Benevente
Orientadora: Prof^a Dr^a Rosicleire Veríssimo Silveira

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia)
– Instituto de Biociências, UNESP, Campus de
Botucatu, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre.

Botucatu – SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Benevente, Cristiane Fernanda.

Análise estereológica da espermatogênese em *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Bryconidae) / Cristiane Fernanda Benevente. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rosicleire Veríssimo Silveira
Capes: 20400004

1. Peixe. 2. Espermatogênese. 3. Síndrome de Células de Sertoli. 4. Caraciformes.

Palavras-chave: Célula de Sertoli; Estereologia; Gerações espermatogônias; Rendimento espermatogênico; Índice meiótico.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CRISTIANE FERNANDA BENEVENTE, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 12 dias do mês de março do ano de 2021, às 08:00 horas, no(a) por meio de videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de CRISTIANE FERNANDA BENEVENTE, intitulada **Análise estereológica da espermatogênese em *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Bryconidae)**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, Profa. Dra. DANIELA CARVALHO DOS SANTOS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Profa. Dra. CRISTIÉLE DA SILVA RIBEIRO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia e Zootecnia / UNESP/Câmpus de Ilha Solteira. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdir B. Benevente e Marcia R. Mestre e a minha irmã, Josiane Regina Benevente, que sempre me ampararam e não mediram esforços para que eu continuasse meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP por todas as oportunidades.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia)- Instituto de Biociências pelo apoio.

A Estação de Aquicultura da Usina Hidrelétrica Mário Lopes Leão, AES-Tietê, em conjunto com a empresa da Big Peixe LTDA-ME, especialmente a Guilherme Antônio de Freitas pela doação dos exemplares de *B. orbigyanus* e por todo apoio logístico.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-, pela bolsa de estudos.

A minha orientadora, Prof.^a Dr^a Rosicleire Verissimo Silveira, a quem considero minha segunda mãe ou como ela mesmo diz “Mãe Científica”, pela confiança, puxões de orelhas sempre que necessário, pela calma, pela amizade, por sempre estar presente quando precisei, e pela confiança que depositou em mim.

Aos membros da banca, que aceitaram meu convite de estar presente neste dia tão importante, e pela contribuição ao meu trabalho.

Aos meus pais, Valdir Benedito Benevente e Márcia Regina Mestre, por sempre apoiarem minhas escolhas e fazer o possível e impossível para eu estar aqui. Pais admiráveis que sempre colocaram a educação e o bem-estar das filhas na frente de tudo. Sou eternamente grata a vocês dois.

A minha irmã, Josiane Regina Benevente, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e querendo sempre coisas boas para mim.

Aos meus amigos do laboratório, no qual tive a oportunidade de crescer como profissional, Prof^o Alexandre Ninhaus, Patrícia, Maria Luiza, Lais, Luciane, Laícia, Barabra, Evillyn, Jéssica, Maiara, Malbelys, Stella, Yane, Yasmim e Bruna. Obrigada pelo tempo que pude compartilhar com vocês.

As melhores amigas que alguém possa ter, Luciane, Maria Luiza, Lais, Patrícia e Igor, que me acolheram e sempre estiveram do meu, me dando forças quando eu mais precisava,

mostrando o quanto eu era capaz. Eu amo vocês! Vocês sempre vão estar comigo, porque vocês são pra vida toda.

Ao Profº Drº Borys Dzyuba e pela Universidade Fakulta rybářství a ochrany vod, Profº Alexandre Ninhaus Silveira a Profª Rosicleire Veríssimo Silveira e todos da pós graduação que faço parte, pela oportunidade de realizar um intercâmbio.

Em especial a Patrícia Postingel Quirino, um anjo na terra que eu tive a oportunidade de conhecer e hoje chamar de amiga. Sempre priorizando aos que ama. Com ela eu aprendi muitos valores profissionais e pessoais. Eu sou eternamente grata por tudo que ela fez por mim e ainda faz. Uma pessoa que sempre está disposta a ajudar aos outros, deixando suas coisas de lado para te ajudar seja, com uma dúvida no laboratório ou qualquer outra. Só eu sei o quanto ela me fez crescer. Pati, você é luz, você merece o mundo, sempre estarei torcendo por você. Obrigada de coração por tudo.

Agradeço a Deus pela minha vida e por todas as oportunidades que eu tive.

Resumo

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, é uma espécie reofílica muito importante para aquicultura, para estudos voltados a diversidade genética, espermatogênese, criopreservação de sêmen, taxonomia e como indicador biológico. Entretanto, sua população vem sofrendo um declínio em consequência de ações antrópicas, como a instalação de barragens hidrelétricas, dentre outros fatores que auxiliaram a perda de estoques naturais, assim, levando a espécie a quase extinção. Frente aos estudos que utilizam a piracanjuba como modelo, atualmente não há uma análise estereológica da espermatogênese nesta espécie que permite a obtenção de resultados quantitativos, por meio de uma avaliação tridimensional da cinética das células testiculares. Diante deste exposto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a espermatogênese de *B. orbignyanus* a partir da análise estereológica, podendo assim, quantificar o número de células germinativas e das células de Sertoli, o número de geração espermatogonial, o rendimento da espermatogênese, índice meiótico e a porcentagem da morte celular. Também realizar uma adequação na nomenclatura e uma redescrição das características das células germinativas. Para tal, os testículos de cinco espécimes de *B. orbignyanus* com um ano de idade foram coletados, fixados em glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% e processados para microscopia de luz. O material foi seccionado em cortes seriados para que ocorresse a quantificação das células. Foram identificados três tipos de espermatogônias: espermatogônia indiferenciada do tipo A e espermatogônias diferenciadas do tipo A e B. Com base no número de espermatogônias B por cistos foi estimado que as espermatogônias sofreram aproximadamente 9 divisões mitóticas antes de se diferenciarem em espermátócito primário. Também foram identificados três tipos de espermátides -inicial, intermediária e final. No cisto de espermátides finais, houve 1204 células germinativas, indicando um rendimento espermatogênico de 58%. Devido ao aumento das células germinativas, também houve um aumento no número de células de Sertoli, cessando seu crescimento na fase espermiogênica. Desta maneira, o entendimento da análise estereológica na espermatogênese é essencial para um melhor entendimento do processo reprodutivo desta espécie, como para as demais espécies.

Palavras-chave: Célula de Sertoli, Estereologia, Gerações espermatogoniais, Índice meiótico, Rendimento espermatogênico.

Abstract

The piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, is a very important reophilic species for aquaculture, for studies aimed at genetic diversity, spermatogenesis, cryopreservation of semen, taxonomy and as a biological indicator. However, its population has been suffering a decline as a result of anthropic actions, such as the installation of hydroelectric dams, among other factors that have helped the loss of natural stocks, thus leading the species to near extinction. In view of the studies that use piracanjuba as a model, there is currently no stereological analysis of spermatogenesis in this species that allows quantitative results to be obtained through a three-dimensional assessment of testicular cell kinetics. In view of this, the present study aims to evaluate the spermatogenesis of *B. orbignyanus* from stereological analysis, thus being able to quantify the number of germ cells and Sertoli cells, the number of spermatogonial generation, the spermatogenesis yield, index meiotic and the percentage of cells death. Also perform an adaptation in the nomenclature and a redescription of the characteristics of the germ cells. For this purpose, the testicles of five specimens of *B. orbignyanus* with one year of age were collected, fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde and processed for light microscopy. The material was sectioned in serial sections so that the cells could be quantified. Three types of spermatogonia were identified: undifferentiated spermatogonia type A and differentiated spermatogonia type A and B. Based on the number of B spermatogonia per cysts it was estimated that the spermatogonia suffered approximately 9 mitotic divisions before differentiating into primary spermatocytes. Three types of spermatids were also identified - initial, intermediate and final. In the final spermatids cyst, there were 1204 germ cells, indicating a spermatogenic yield of 58%. Due to the increase in germ cells, there was also an increase in the number of Sertoli cells, stopping their growth in the spermatids phase. Thus, the understanding of stereological analysis in spermatogenesis is essential for a better understanding of the reproductive process of this species, as well as for the others species.

Keywords: Meiotic index, Sertoli cell, Stereology, Spermatogonial generation, spermatogenic yield.

Sumário

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
ORGANIZAÇÃO TESTICULAR EM PEIXES	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
OBJETIVOS	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODO	38
2.1. ÉTICA	38
2.2. ANIMAIS E PROTOCOLOS	38
2.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	38
2.4. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA	39
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
3. RESULTADOS	40
4. DISCUSSÃO	45
5. REFERÊNCIAS	47

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os Characiformes formam o maior e mais diversos grupo de peixes de água doce distribuídos na América e África e apresentam grande importância na pesca, na aquicultura, na aquariofilia (peixes ornamentais) e na ecologia geral dos ecossistemas (BUCKUP, MENEZES e GHAZZI, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; NELSON, GRANDE e WILSON, 2016; FRICKE, ESCHMEYER e FONG, 2020). Os peixes desta ordem apresentam variações na estrutura mandibular, anatomia interna, alimentação (VARI, 1998; BUCKUP, 1998), bem como no comprimento do corpo, a exemplo, do gênero *Astyanax* podem apresentar menos de 3 cm de comprimento (KAVALCO, 2008), enquanto a espécie *Hydrocynus goliath* chega medir até 150 cm de comprimento (GERY, 1977).

Os Characiformes contam com mais de 2.300 espécies descritas, em 24 famílias, sendo 19 exclusivamente de peixes neotropicais (Nelson et al., 2016; Fricke et al., 2020). Dentre essas famílias, a Bryconidae se destaca por sua ampla distribuição geográfica, importância comercial, diversidade de espécie e indicador ambiental (ABE et al., 2014). Atualmente, há 50 espécies validadas e, cerca de 89 espécies para avaliação, divididas nas subfamílias Bryconinae e Salmininae (FRICKE, ESCHMEYER e FONG, 2020).

Nos Bryconinae, o gênero *Brycon* dispõe de mais de 40 espécies válidas, composta por peixes de grande porte, com mais de 70 cm de comprimento, distribuídas do Sul do México até América do Sul (LIMA, 2004; FRICKE, ESCHMEYER e FONG, 2020), entre elas estão *Brycon cephalus* Günther, 1869, *Brycon amazonicus* Valenciennes 1850, *Brycon hilarii* Valenciennes 1850, *Brycon orbignyanus* Valenciennes 1849 e *Brycon pesu* Müller e Troschel 1845.

O *Brycon orbignyanus*, um peixe neotropical de água doce, popularmente conhecido como piracanjuba, era inicialmente encontrado por toda Bacia do Prata, formada pelos Rios Paraná, Uruguai e Paraguai (REIS 2003; LIMA 2017), no entanto, Bertoletti e colaboradores (1989) e Zamboni, Nuñez e Meurer, (2000) não encontraram nenhum espécime de *B. orbignyanus* no alto Uruguai e, de acordo com Agostinho, Zaniboni-Filho e Lima (2004) a espécie também está praticamente extinta em parte do Alto Paraná. Devido a essa queda da população, atualmente a piracanjuba é encontrada unicamente nas bacias do Rio Grande e Paranapanema e em alguns trechos não represados do rio Paraná e, entre o reservatório de Itaipu e Porto Primavera (AKAMA et al., 2018).

No presente momento, a piracanjuba está listada no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (BRASIL, 2018) na categoria em perigo de extinção (EM - A2c), em

vista a sua visível sensibilidade e intolerância a ambientes alterados (ZAMBONI-FILHO e SCHULZ, 2003; LOPERA-BARRERO, 2009). Além disso, as populações remanescentes demonstram uma baixa variabilidade genética, dado que reflete diretamente na manutenção da espécie no futuro (ASHIKAGA et al., 2015).

Considerada um peixe de grande porte, possui comprimento oscilando entre 68 - 80 cm de comprimento, corpo com cor acinzentada, sendo alongado e fusiforme, o dorso apresenta cor cinza-esverdeado com uma mancha umeral azulada e, a nadadeira caudal possui coloração avermelhada (GODOY, 1975; CECCARELLI et al., 2005). Semelhante a alguns peixes do gênero, quando adulto, apresenta hábito alimentar onívoro, alimentando-se de frutas e sementes, entretanto, no período larval apresenta um hábito alimentar carnívoro (CAVALCANTI, 1998; ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003; CECCARELLI et al., 2005).

Como outras espécies de Bryconidae, a piracanjuba também apresenta dimorfismo sexual no período reprodutivo, os machos apresentam os primeiros raios da nadadeira caudal ásperos pela presença de espículas e, normalmente, as fêmeas são maiores que os machos (FURUYA e FURUYA, 2001; MOREIRA et al., 2001; CECCARELLI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2005; GODINHO, 2007; PEREIRA, 2012; LENIS-SUCERQUIA, CRUZCA-SALLAS, DAVID-RUALES, 2015; NUNES et al., 2015; BRANDÃO e BAZZOLI, 2017).

Estudos apontam que a partir do primeiro ano para os machos e o terceiro para as fêmeas, a piracanjuba atinge a maturidade sexual (VAZ, TORQUATO E BARBOSA, 2000; ZAMBONI-FILHO e SCHULZ, 2003; CECCARELLI et al., 2005). Assim, como outras espécies de peixes neotropicais reofílicos, é necessário que realizem migrações reprodutivas entre os meses de outubro a janeiro, além disso, apresentam fecundação externa, desova total e sazonal e o desenvolvimento oocitário é sincrônico (WINEMILLER, 1989; CASTAGNOLLI, 1992; VAZZOLER e MENEZES, 1992; VAZZOLER, 1996; ZAMBONI-FILHO e SCHULZ, 2003; CECCARELLI et al., 2005, HILSDORF e MOREIRA, 2008).

As migrações reprodutivas acontecem no período conhecido por piracema, no qual os peixes realizam longas jornadas subindo o rio, contra a correnteza, vencendo muitos obstáculos naturais, como cachoeiras e corredeiras e, artificiais, em busca de áreas propícias para a desova e alimentação das larvas (CAROLSFELD et al., 2003; HILSDORF e MOREIRA, 2008; IEF, 2010; DE SOUSA, 2014; SILVA, 2020). Esse fenômeno acontece todos os anos e é modulado por fatores endógenos e exógenos (LOWE-MCCONNELL, 1999; HILSDORF e MOREIRA, 2008). Primeiramente, sinais ambientais (fatores exógenos) como o aumento da temperatura, do fotoperíodo e das chuvas são captados pelos olhos, narinas e receptores cutâneos do peixe,

e então, processados e convertidos em mensagens neurais (LOWE-MCCONNELL, 1999). O eixo responsável pelo processamento dos sinais ambientais e, posteriormente, pelas respostas hormonais (fatores endógenos) é o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (BONETTO, 1963; VAZZOLER 1996, VENTURIERI e BERNARDINO, 1999; HILSDORF e MOREIRA, 2008; ANDRADE et al., 2015; LEIRA et al., 2018).

Frente a isso, no dia 12 de fevereiro de 1988 foi sancionado e decretado a Lei nº 7.653 que proíbe a pesca no período de migração de espécies nativas de peixes brasileiros (BRASIL, 1988), sendo denominado, período de defeso, que visa controlar a pesca na época da reprodução dos peixes, assegurando a reposição dos estoques (VASQUES e COUTO, 2011).

Tanto nos machos como nas fêmeas, o desenvolvimento gonadal e maturação dos gametas para posterior fecundação ocorre neste período de migração, porém, quando a migração destes animais é de alguma forma interrompida o processo natural de maturação dos gametas é alterado (SILVA, 2020) e, os principais causadores pela interrupção da migração dos peixes são: construções de barragens para usinas hidrelétricas que causam represamento dos rios e modificam o fluxo das águas; fragmentações de habitats, que provocam o desaparecimento das vegetações ribeirinhas, afetando diretamente na disponibilidade de alimento do espécime adulto, além de modificar e/ou destruir áreas de desovas (GODOY, 1975; QUIROS, 1990; ESPINACH-ROS e PARODIS, 1997; AGOSTINHO, THOMAZ e GOMES, 2005; CECCARELLI et al., 2005)

Além dos fatores citados acima, poluição das águas, introdução de espécies exóticas e atividades pesqueiras - predatórias e esportivas-, contribuem diretamente na queda da população de *B. orbignyanus*, uma vez que, sua carne é de excelente qualidade e apreciada, mostrando um grande valor comercial e, seu comportamento agressivo é apreciado entre os pescadores (LIMA e CASTRO, 2000; HILSDORF et al., 2002; ZAMBONI-FILHO e SCHULZ, 2003; CECCARELLI et al., 2005; ROSA e LIMA, 2008; OLIVEIRA et al., 2017, BRASIL, 2020).

Diante deste cenário, a espécie *B. orbignyanus* é considerada uma espécie sensível a alterações ambientais e vem destacando-se como modelo biológico de estudos: biogeográficos e como indicador ambiental, uma vez que, o reaparecimento da espécie em áreas antes degradadas é um sinal de que aquela área voltou a ter o mínimo possível para a sobrevivência da espécie (ABE et al, 2014; ASHIKAGA et al., 2015; LOPERA-BARRERO, 2009); bem como estudos taxonômicos (TRAVERNIZOLI et al., 2015; PEREIRA e CASTRO, 2016; ARRUDA et al., 2019); conservacionistas (OLIVEIRA et al., 2017); genéticos (YASBECK et al., 2018), criopreservação do sêmen e embrião (MURGAS et al., 2003; MURGAS et al., 2004;

MARIA et al., 2006; GALO et al., 2011; MARIA e CARNEIRO, 2012; FORNARI et al., 2014) e estudos científicos ligados a reprodução destes animais (DUMONT-NETO et al., 1997; AIRES et al., 2000; GANECO et al., 2001; GANECO et al., 2003; ZANIBONI-FILHO et al., 2007; GANECO et al., 2008; CASTRO, 2015; ZARDO, 2018).

Neste sentido, a espermatogênese é um dos aspectos avaliados na biologia reprodutiva dos peixes, sendo um processo complexo e altamente coordenado, no qual as células diploides iniciais conhecidas como espermatogônias e, consideradas como células tronco, sofrem proliferação e diferenciação para produzir as células haploides, ou seja, os espermatozoides (GRIER et al., 1980; NÓBREGA et al., 2009; SHULZ et al., 2010).

ORGANIZAÇÃO TESTICULAR EM PEIXES

Na maioria dos machos dos peixes teleósteos, o testículo é envolto pelo tecido conjuntivo fibroso, é um órgão par e alongado, unidos somente na extremidade caudal, localizado na cavidade celomática. Sua espessura difere de acordo com o ciclo reprodutivo, apresentando uma estrutura delgada e filiforme fora do período reprodutivo e, uma estrutura mais consistente e robusta no período reprodutivo. No entanto, a coloração do testículo e sua massa também dependem do período reprodutivo, do desenvolvimento e da alimentação do animal (GRIER, 1981; ALEXANDRINO et al., 1985; RATTY, 1990; KOULISH, KRAMER e GRIER, 2002; QUAGIO-GRASSIOTTO, ANTONELI e OLIVEIRA, 2003).

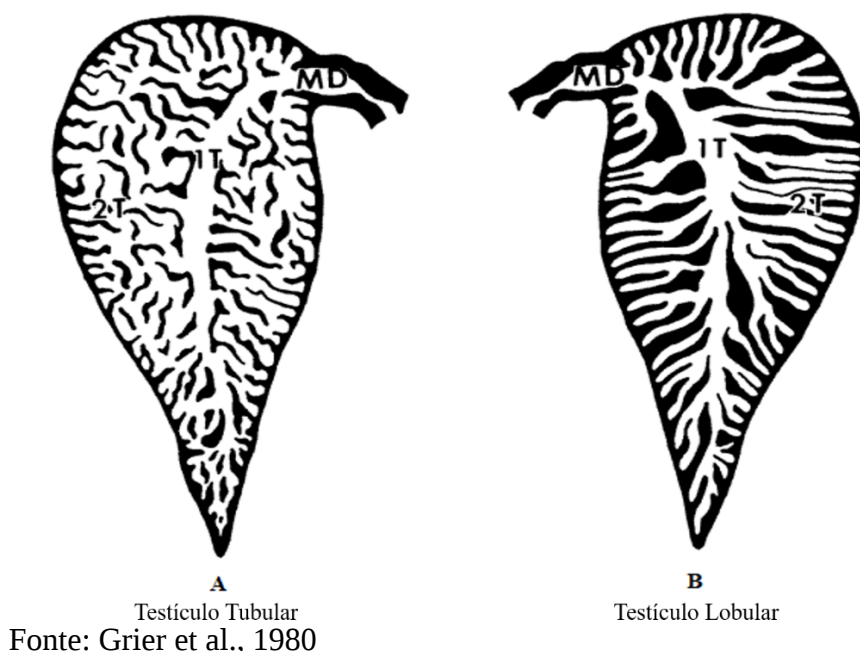
No testículo é possível distinguir dois tipos distintos de compartimentos: o compartimento intersticial ou intertubular, responsável pela esteroidogênese (produção hormonal) e, o germinativo (tubular/lobular) responsável pela espermatogênese (formação do espermatozóide), sendo separados por uma membrana basal (GRIER, 1981, 1993; NAGHAMA, 1983; GRIER e LO NOSTRO, 2000; KOULISH, KRAMER e GRIER 2002; GRIER e URIBE-ARANZÁBAL, 2009).

O compartimento intersticial/intertubular é composto por vasos sanguíneos, células mioides, tecido conjuntivo e nervoso e, células de Leydig (GRIER, VAN DEN HURK E BILLARD, 1989; PUDNEY, 1995; KOULISH, KRAMER e GRIER 2002). Adicionalmente, o compartimento germinativo é composto pelas células somáticas (célula de Sertoli) e, as células germinativas (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoide) (GRIER, 1993, 2002; GRIER e LO NOSTRO, 2000; GRIER, URIBE e PARENTI, 2007).

Com relação a organização desses compartimentos, o testículo pode ser classificado em dois tipos: i) Tubular Anastomosado e, ii) Lobular (GRIER, 1980). No testículo do tipo tubular anastomosado, o compartimento germinativo é formado por alças e túbulos que se

interconectam da periferia até o ducto testicular, formando uma rede anastomosada, sendo difícil identificar onde começa e termina o túbulo (Fig. 1A). Este tipo testicular é presente nos peixes mais basais como os salmonídeos, ciprinídeos e lepisosteídeos (GRIER, 1993; PUDNEY, 1995). No entanto, no testículo lobular, o compartimento germinativo, possui um formato digitiforme, se estendendo para a periferia do testículo e terminando em um fundo cego (Fig. 1B). Neste tipo testicular, conforme a disposição das espermatogônias ao longo do lóbulo, pode-se classificar o tipo lobular de duas maneiras: restrito ou irrestrito (Fig. 2). (GRIER, 1993; LOIR, et al., 1995; PUDNEY, 1995).

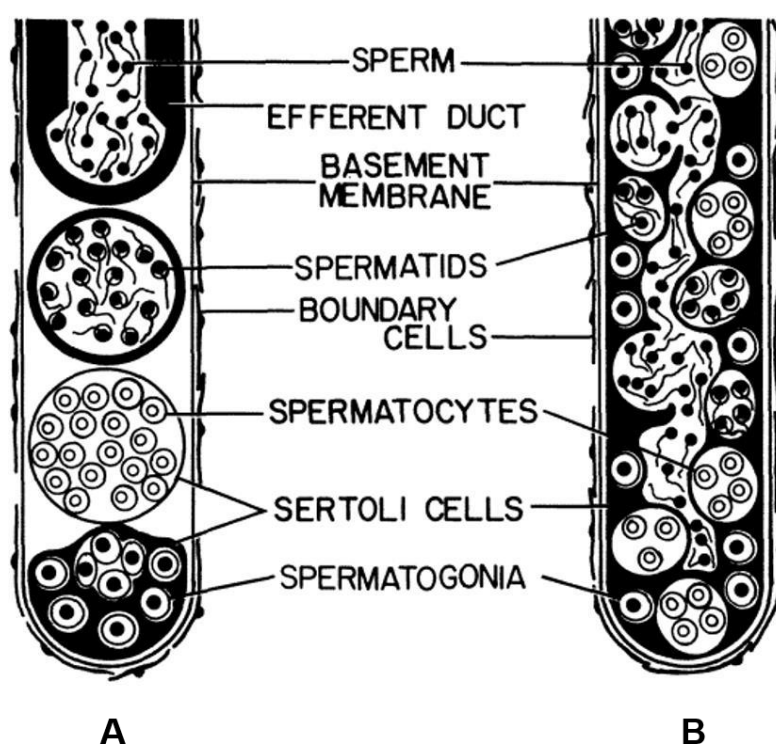
Figura 1: Diferentes arranjos dos túbulos testiculares e do (s) ducto (s) principal (MD) foram observados no testículo de peixes. Os ductos principais longitudinais podem estar localizados ao longo da borda dorsal do testículo ou dentro do mesentério que liga o testículo à parede corporal dorsal. Os túbulos dorsoventrais primários (1T) se estendem do ducto principal e podem se ramificar dentro do próprio testículo (A e B). Destes, os túbulos secundários (2T) se estendem lateralmente em direção à periferia testicular (A e B). Os túbulos secundários podem ser anastomosados (A) ou ramificados (B). Os túbulos secundários podem ser anastomosados (A) ou ramificados. Diferentes arranjos dos túbulos testiculares e do (s) ducto (s) principal (MD). Traduzido de Grier et al., 1980



Assim, os testículos do tipo lobular restrito, presente em Atherinomorpha, as espermatogônias são encontradas somente na região periférica dos lóbulos, desta forma, durante a espermatogênese, os cistos de espermatogônias migram ao longo do lóbulo em direção ao ducto eferente (Fig. 2A). Diferente do lobular restrito, o testículo lobular irrestrito, presente em Neoteleostei, as espermatogônias não estão confinadas apenas em um local, assim, podendo ser encontradas por toda a extensão do lóbulo (Fig. 2B) (GRIER et al., 1980; GRIER, 1993;

GRIER e LO NOSTRO, 2000; PARENTI e GRIER, 2004; GRIER e URIBE-ARANZÁBAL, 2009).

Figura 2: Representações esquemáticas de dois tipos testiculares tubulares observados em teleósteos. O "testículo espermatogonial restrito" (A) é típico de *F. grandis*, *F. seminolis* e outros Atheriniformes. Os cistos se formam no terminal distal do túbulo, mas entram em contato com os ductos eferentes antes da espermição. Durante a espermição, as células de Sertoli do cisto se transformam e se tornam células do ducto eferente. No "tipo testicular espermatogonial irrestrito" B), típico de Salmoniformes, Perciformes e Cypriniformes, as espermatogônias estão localizados ao longo do comprimento do túbulo. Traduzido e modificado de Grier et al., 1980



Fonte: Grier et al., 1980

No compartimento germinativo o epitélio pode se apresentar de duas maneiras: contínuo ou descontínuo (GRIER, 1993; GRIER e TAYLOR, 1998). O epitélio contínuo é caracterizado por possuir uma população contínua de células germinativas e células de Sertoli por todo o comprimento do lóbulo. No entanto, no epitélio descontínuo há perdas graduais das células germinativas, em razão da liberação dos espermatozoides, entretanto, essa descontinuidade do epitélio não ocorre de maneira uniforme (GRIER e TAYLOR, 1998; GRIER e LO NOSTRO, 2000; BROWN-PETERSON et al., 2002; GRIER e ARANZABAL, 2009).

Deste modo, a partir das características do epitélio germinativo (EG) contínuo ou descontínuo e das células germinativas presentes, foi possível estabelecer fases do desenvolvimento testicular, inicialmente proposto por Grier (1981) e posteriormente

padronizado por Brown-Peterson e colaboradores (2011), criando assim, uma classificação para auxiliar na melhor compreensão da maturação testicular (Tabela 1).

Tabela 1: Descrições macroscópicas e microscópicas das fases do ciclo reprodutivo de peixes machos. O tempo dentro de cada fase depende das espécies. Alguns critérios listados para fases podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva ou temperatura da água. As subfases que se aplicam a todos os peixes são listados; adicional as subfases podem ser definidas por pesquisadores individuais (EG: epitélio germinativo; Sg1: espermatogônia primária; Sg2: espermatogônia secundária; Sc1: espermatócito primário; Sc2: espermatócito secundário; St: espermatíde; Sz: espermatozóides). Traduzido de Brown-Peterson et al., (2011).

FASE	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS
IMATURO (Nunca desovou)	Testículos pequenos, geralmente claros e com aparência de fio. Apenas SG1 presente; sem lúmen nos lóbulos
DESENVOLVIMENTO (Testículos começam a crescer e se desenvolver)	Testículos pequenos, mas facilmente identificados. Espermatocistos evidentes ao longo dos lóbulos. SG2, SC1, SC2, ST E SZ podem estar presentes nos espermatocistos. SZ não está presente no lúmen dos lóbulos ou nos ductos espermáticos. EG contínuo por toda parte. subfase de desenvolvimento inicial: SG1, SG2 E SC1 apenas
APTO A DESOVA (Peixes estão se desenvolvendo e fisiologicamente capazes de desovar neste ciclo)	Testículos grandes e firmes. SZ no lúmen dos lóbulos e / ou ductos espermáticos. Todos os estágios da espermatogênese (SG2, SC, ST, SZ) podem estar presentes. Espermatocistos em todo o testículo, espermatogênese ativa. O EG pode ser contínuo ou descontínuo. subfase de desova ativa (macroscópica): leite liberado com uma leve pressão no abdômen. subfases histológicas baseadas na estrutura do EG. GE inicial: EG contínua em todos os lóbulos ao longo dos testículos. EG médio: EG contínuo em espermatocistos na periferia do testículo, EG descontínuo em lóbulos próximos aos ductos. EG tardio: EG descontínuo em todos os lóbulos ao longo dos testículos
REGRESSÃO (Cessão a desova)	Testículos pequenos e flácidos, sem liberação de sêmen com pressão. SZ residual presente no lúmen dos lóbulos e nos ductos espermáticos. Espermatocistos amplamente dispersos perto da periferia contendo SC2, ST, SZ. pouca ou nenhuma espermatogênese ativa. Proliferação espermatogonial e regeneração de EG comuns na periferia dos testículos
REGENERAÇÃO (Sexualmente madura, reprodutivamente inativa)	Testículos pequenos, geralmente semelhantes a fios. Sem espermatocistos. O lúmen do lóbulo geralmente não existe. Proliferação da espermatogônia ao longo dos testículos. EG contínuo por toda parte. Pequena quantidade de SZ residual ocasionalmente presente no lúmen dos lóbulos e no ducto espermático.

Fonte: Brown-Peterson et al., 2011.

A espermatogênese nos peixes ocorre de forma semelhante à de outros vertebrados. É um processo complexo, conservativo e regulado, no qual uma célula germinativa pouco diferenciada se desenvolve e dá origem aos espermatozoides, essencial na manutenção da fertilidade dos machos. Em comparação aos mamíferos, a espermatogênese em peixes é mais curta, além de ser influenciada pela água, pois a motilidade do gameta masculino é ativado quando entra em contato com água (VAN LOOK e KIME, 2003; GRIER e URIBE-ARANZÁBAL 2009; NOBREGA, BATLOUNI e FRANÇA, 2009; SCHULZ et al., 2010; ZORAH 2010; GARCIA, 2017). Tal processo é tão importante para a manutenção da vida que pode ocorrer de duas formas em peixes: a espermatogênese semicística e cística (MATTEI et al., 1993; SCHULZ et al., 2010).

Na espermatogênese semicística o desenvolvimento das espermatogônias e dos espermatócitos ocorrem dentro de cistos, formados pelas junções citoplasmáticas das células de Sertoli e, ao final da meiose II, os cistos se rompem liberando assim, as espermátides no lúmen do lóbulo, onde, terminam o seu desenvolvimento. (MATTEI et al., 1993).

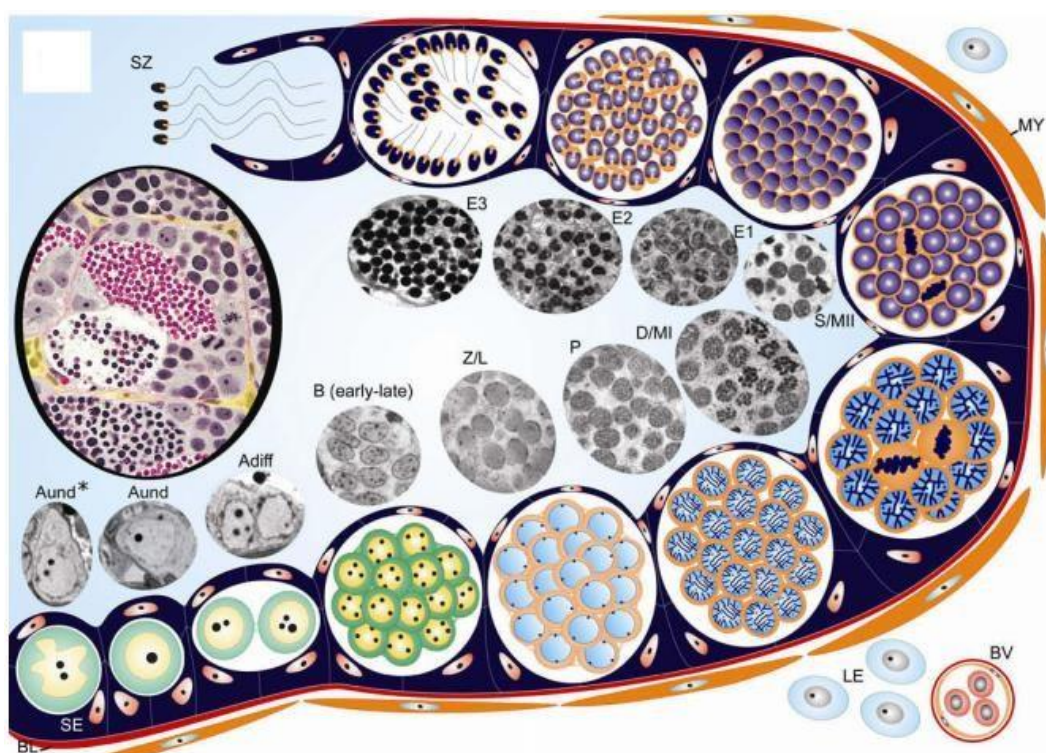
Já na espermatogênese cística todo o desenvolvimento das células germinativas ocorre dentro de cistos, estes são formados por projeções citoplasmáticas da célula de Sertoli, no qual são rompidas apenas no último estágio da espermátide (Fig. 3). No interior dos cistos, as células germinativas estão conectadas uma as outras por pontes citoplasmáticas, devido a citocinese incompleta que ocorre nas divisões celulares, deste modo, tornando todo o desenvolvimento celular sincrônico (GRIER, 1981, 2002; GRIER; URIBE-ARANZÁBAL, 2009; NOBREGA, BATLOUNI e FRANÇA, 2009; SCHULZ et al., 2010).

Basicamente, a espermatogênese cística pode ser dividida em três fases distintas: I) mitótica ou proliferativa, II) meiótica e, III) espermiogênica, que acontecem de forma simultânea e sincrônica no compartimento germinativo de acordo com a fase reprodutiva em que o testículo se encontra. SCHULZ et al., 2010).

Na primeira fase da espermatogênese, um cisto contendo apenas uma célula indiferenciada (espermatogônia indiferenciada do tipo A, Spg Aind) está envolto por uma célula de Sertoli, sofre uma divisão mitótica, dando origem a duas espermatogônias diferenciadas do tipo A (Spg A) (Fig. 3). A partir deste momento, ocorrem sucessivas divisões mitóticas e o primeiro grande aumento no número de células germinativas e células de Sertoli. Por sua vez, o cisto de Spg A, dá origem as espermatogônias do tipo B (Spg B) (Fig. 3), sendo este, o último tipo espermatogonial. As Spg B passam por mais divisões mitóticas, tendo outro aumento drástico no número de células no cisto (Fig. 3). Estes aumentos tanto das células germinativas como das células de Sertoli, podem ser quantificados através da análise estereológica, além de

fornecer o número de gerações das espermatogônias da espécie e o diâmetro nuclear de cada tipo celular (PUDNEY, 1996; LE GRAC e LOIR, 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2001; LEAL et al., 2009; SCHULZ et al., 2010; QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2017; SOUTO et al., 2017; ZARDO, 2018).

Figura 3: Testículo do tipo cístico do zebra-fish. Células de Sertoli (SE), lâmina basal (BL), células mioides peritubulares (MY), células intersticiais de Leydig (LE), vasos sanguíneos (BV), espermatogônia indiferenciada* do tipo A (Aund *) (espermatogônia-tronco); espermatogônia indiferenciada do tipo A (Aund); espermatogônia diferenciada tipo A (Adiff); espermatogônia tipo B [B (precoce-tardio)]; espermatócitos primários em leptóteno/zigóteno (L / Z); espermatócitos primários em paquíteno (P); espermatócitos em diplóteno/metáfase I (D / MI); espermatócitos secundários/metáfase II (S / MII); espermátides precoces (E1), intermediárias (E2) e finais (E3); espermatozóides (SZ). Retirado de Schulz e Nóbrega, 2010



Fonte: Schulz e Nóbrega, 2010

Durante o processo mitótico, os nucléolos desaparecem, os cromossomos duplicados aparecem como cromátides-irmãs, inicia-se a formação do fuso mitótico, posteriormente, o envelope nuclear fragmenta-se, os cromossomos condensam ainda mais, os centrômeros se posicionam em lados opostos da célula, ocorre a formação da placa metafásica, as cromátides-irmãs se separam, os cromossomos filhos migram para a extremidade, assim, formam-se duas células diploides (REECE et al., 2015) Nas células formadas o envelope nuclear volta a se formar, o nucléolo reaparece, os cromossomos tornam-se menos densos e não ocorre a

citocinese completa (REECE et al., 2015). Ao termino da divisão mitótica, as Spg B sofrem um processo de diferenciação, para assim, darem origem aos espermatócitos primários, células da segunda fase da espermatogênese (SCHULZ et al., 2010).

Os espermatócitos primários sofrem a primeira divisão meiótica, chamada de meiose I ou divisão reducional. Neste período é possível identificar as etapas da prófase I – leptóteno/zigóteno, paquíteno e diplóteno. Durante a meiose I ocorre a condensação dos cromossomos, o desaparecimento do nucléolo, o pareamento dos cromossomos homólogos e o crossing over. Ao término da meiose I, tem-se os espermatócitos secundários e o início da meiose II, também conhecida como divisão equacional, um vez que, ao final tem-se a metade do número de cromossomos da célula-mãe e, esta fase é marcada pela segregação das cromátides irmãs, que, juntamente com o crossing over geram a diversidade genética, resultando na formação de quatro células haplóides, as espermátides, lembrando que, assim como na mitose, a citocinese na meiose continua incompleta (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2001; GRIER e URIBE-ARANZÁBAL, 2009; SCHULZ et al., 2010; ZOHAR et al., 2010; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012; REECE et al., 2015).

Na última fase da espermatogênese – a espermiogênese-, é marcada por mudanças morfológicas que ocasionam a diferenciação das espermátides em espermatozoides (SCHULZ et al., 2010) Os cistos espermáticos podem ser divididos em espermátides: iniciais, intermediárias e finais. Neste momento, não há mais nenhum tipo de divisão celular, sejam elas mitóticas ou meióticas, mas sim uma diferenciação celular e mudanças estruturais e morfológicas. Tais mudanças são a máxima compactação nuclear, formação da peça intermediária, aparecimento do flagelo, eliminação de organelas e citoplasma. Todo resíduo gerado no cisto é fagocitado pelas células de Sertoli. Ao final da espermiogênese, ocorre a ruptura das pontes citoplasmáticas e os espermatozoides ficam individualizados e, logo, as junções citoplasmáticas da célula de Sertoli, formadoras do cisto celular, são rompidas e os espermatozoides são liberados no lúmen, prontos para serem liberados e para, posterior, fecundação (PLÖEN e COURTENS, 1986; GRIER, 1992, AIRES et al., 2000, QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2001; SCHULZ e MIURA, 2002, BATLOUNI et al., 2005; GRIER e URIBE-ARANZÁBAL, 2009, SCHULZ et al., 2010; ZARDO, 2018).).

Diante do exposto acima, o conhecimento do ciclo reprodutivo e das características morfológicas das células germinativas, é fundamental para a compreensão da espermatogênese (RODRIGUES et al., 2015; CHAGAS, NINHAUS-SILVEIRA, VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2016; ZARDO, 2018; POSTINGEL-QUIRINO et al., 2020). Entretanto, nos últimos anos, outra ferramenta vem sendo utilizada para se obter um melhor entendimento da

espermatogênese, a análise estereológica (VILELA et al., 2003, SCHULZ et al., 2005, LEAL et al., 2009, VIGOYA, 2016; RODRIGUES et al., 2017).

A análise estereológica é um recurso que permite a obtenção de resultados quantitativos, a partir de amostras sistemáticas, uniformes e aleatórias, podendo ser aplicado a qualquer estrutura em que o estudo morfométrico for possível (DEHOFF, 2000; DIAS, 2010). A quantificação das estruturas, através de imagens – seja por lâmina, radiografias, ultrassom – podem ser feitas de duas maneiras: ópticas ou físicas. A quantificação óptica é realizada com o suporte de um software, no entanto, a quantificação física usa planos físicos (RIBEIRO et al., 2004; RIBEIRO, 2006; LADD et al., 2010; LADD et al., 2012). A partir dos meios de quantificação pode-se estimar o volume (μm^3), densidade de volume ($V_v \%$), diâmetro (μm), área, número de partículas, entre outros parâmetros (FREERE, 1967; WEIBEL, 1963; MANDERIM-DE-LACERDA, 1995).

Frente a isso, os estudos que utilizam essa ciência para abordar a espermatogênese, buscam um melhor entendimento da dinâmica do número das células germinativas com o número de células de Sertoli, além do entendimento dos mecanismos celulares envolvidos nos eventos mitóticos e meióticos e, uma melhor compreensão da cinética celular – equilíbrio entre a morte celular ou apoptose e, a proliferação celular, como vemos nos trabalhos com as espécies *Astyanax altiparanae*, *Oreochromis niloticus*, *Prochilodus lineatus*, *Cyprinus carpio* e *Danio rerio*, que, assim como este trabalho, buscam um melhor entendimento da espermatogênese. Além disso, está a análise estereológica ajuda a relacionar o volume do testículo entre as desovas, além de auxiliar na quantificação da produção espermática. (VILELA et al., 2003; SCHULZ et al., 2005; LEAL et al., 2009; MADUREIRA et al., 2011; HUSZNO E KLAG, 2012; COSTAS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; VIGOYA, 2016; DIAS et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017).

Deste modo, trabalhos que desejam obter resultados quantitativos e mais aprofundados da espermatogênese, torna-se essencial o uso da análise estereológica, para assim, trazer resultados eficientes e confiáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.T., MARIGUELA, T.C., AVELINO, G.S., FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.

Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. *BMC Evolutionary and Biology*, v.14, n. 152, p. 1–15, Jun. 2014.

AGOSTINHO, A. A.; BINI, L. M. GOMES, L. C. JÚLIO-JÚNIOR, H. F.; PAVANELLI, C. S. AGOSTINHO, C. S. Fish assemblages. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; THOMAZ, S. M.; HAHN, N. S. (ed.). The upper Paraná river and its Floodplain: physical aspects, ecology and conservation. Leiden: The Netherlands, Backhuy 2004 p.223- 246.

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 646–652, Mai. 2005.

AIRES, E. D.; STEFANINI, M. A.; ORSI, A. M. Características ultra-estruturais e diferenciativas das espermatídes de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermiogênese. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 37, n.3, 183-188, 2000.

AKAMA, A., et al

. *Brycon orbignyanus*. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI - Peixes. Brasília: ICMBio. 2018, p. 91- 94.

ALEXANDRINO, A. C. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. *Bolm. Zool.*, Univ. S. Paulo. v.9, p. 159-175, 1985.

ANDRADE, E.S.; ANDRADE, E. A.; FELIZARDO, V. O.; PAULA, D. A. J.; VERAS, G. C.; MURGAS, L. B. S. Biologia reprodutiva de peixes de água doce. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.195-201, jan./mar. 2015.

ARRUDA, P. S. S.; FERREIRA, D. C.; OLIVEIRA, C.; VENERE, P. C. DNA Barcoding Reveals High Levels of Divergence among Mitochondrial Lineages of *Brycon* (Characiformes, Bryconidae). *Genes*, v. 10, n. 639, p. 1-12, 2019.

ARTONI, R. F; VICARI, R.F; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de peixes neotropicais. *Biological and Health Sciences*, v. 6, n. 1, p. 43-60, 2000.

ASHIKAGA, F. A.; ORSI, M. L.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A. FORESTI, F. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation, *Environ Biol Fish*, v.98, p.1845–1855, 2015.

BATLOUNI, S. R.; CARREÑO, F. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatus* (Pisces, Siluriformes). *J. Mol. Hist.*, v.36, p. 97-110, 2005.

BERTOLETTI, J. J.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, L. R.; REIS, R. E. Ictiofauna do rio Uruguai superior entre os municípios de Aratiba e Esmeralda, Rio Grande do Sul, Brasil. *Comum. Mus.Ciênc.*, Porto Alegre, v.48, p.3–42, Dec. 1989.

BONETTO, A. A. Investigaciones sobre migraciones de peces en los rios de la cuenca del Plata. *Ciência e Investigación*, v. 19, p.12–26, 1963

BRANDÃO, L. E. D; BAZZOLI, N.. Parâmetros reprodutivos de *Brycon nattereri* (Pisces:Characidae), espécie ameaçada de extinção. In: JEUNON, F. A.; LOBATO, W.; HANRIOT, S. M. (Org.). Livro de destaques do 24º Seminário de Iniciação Científica da PUC Minas. 2017 ed. Belo Horizonte: Editora PUC Minas, 2017, v. 2017, p. 16-28.

BRASIL (1988). Lei nº 7.653, de 12 de fevereiro de 1988. Altera a redação dos arts. 18, 27, 33 e 34 da Lei nº 5197, de 03 de janeiro de 1967, que dispõe sobre a proteção à fauna, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7653.htm>.

BRASIL. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI – Peixes. Brasília - DF, 2018. 1232 p

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Peixes - *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) - Piracanjuba. Brasília. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira?id=6219:especie-6219>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

BRITSKI, H. A. Conhecimento atual das relações filogenéticas de peixes neotropicais. In Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil (A.A. Agostinho & E. Benedito- Cecílio, eds.). Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia, Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, p. 43-57, 1992.

BROWN-PETERSON, N. J.; GRIER, H. J.; OVESTREET, R. M. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *Journal of Fish Biology*, v.60, p. 178- 202, 2002.

BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, v. 3, n. 1, p.52- 70, Jan. 2011.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional, Rio de Janeiro, p. 195, 2007

BUCKUP, P.A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Edipucrs, Porto Alegre, 1998, p. 123-144.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; BAER, A.; ROSS, C., 2003 Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries, and Conservation Status. Ottawa: World Fisheries Trust, 2003. 373 p.

CASTAGNOLLI, N. Criação de peixes de água doce. Jaboticabal: Funep, 1992.

CASTRO, P. L. de. Contribuição genética e reprodutiva de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e extrusão. 2015. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015

CAVALCANTI, C.A. Proteases digestivas em juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Eigenmann, 1909) e aplicação da técnica de digestibilidade "in vitro". 1998. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

CECCARELLI, P.S.; SENHORINI, J. A.; CANTELMO, O. A.; REGO, R. F. Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 2005. p.121- 147.

CHAGAS, J. M. A.; NINHAUS- SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Ciclo testicular de *Devario aequipinnatus* (Teleostei, Cyprinidae): Um potencial modelo biológico em experimentação animal. Bol. Inst. Pesca, v.42, n.4, p. 765-779, 2016.

COSTA, F. G.; ADOLFI, M. C.; GOMES, C. C.; JESUS, L. W. O.; BATLOUNI, S. R.; BORELLA, M. I. Testes of *Astyanax altiparanae*: The Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis. Micron, v.61, p.20-27, 2014.

DE SOUSA, J. C. R. A pesca predatória no rio Cuiabá como crime ambiental, realizada no município de Cuiabá no período de piracema. Homens do Mato-Revista Científica de Pesquisa em Segurança Pública, v. 6, n. 1, p. 122-137, 2014.

DEHOFF, R. T. Probes, populations, samples, measurements and relations in stereology. Image Anal. Stereol., v.19, p.1-8, 2000.

DIAS, G. C. M.; CASSEL, M.; JESUS, L. W. O.; BATLOUNI, S. R.; BORELLA, M. I.. Spermatogonia, germline cells, and testicular organization in the characiform *Prochilodus lineatus* studied using histological, stereological, and morphometric approaches. Anatomical Record, v. 300, n. 3, p. 589–599, 2017.

DIAS, V. Laboratório da FMVZ é referência mundial em Estereologia. 2010. Disponível em: <http://www.usp.br/agen/?p=17194>. Acesso em: 23 fev. 2020.

DUMONT-NETO, R.; PELLI, A., FREITAS, J. L.; COSTA, C. L.; FREITAS, A. E.; BARBOSA, N. D. C. Reprodução induzida da piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1903) durante a primeira maturação sexual, cultivada em cativeiro na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental de Volta Grande-CEMIG. B. Inst. Pesca, v. 24, p.105-107, 1997.

ESPINACH-ROS, A.; PARODIS, C. R. Conservación de la fauna ictica en el Embalse de Salto Grande. Publicacion de la comision administradora del Rio Uruguay y la comision técnica mixta de Salto Gande, Montevideo. p. 297-330, 1997.

FORNARI, D. C., STREIT-JUNIOR, D. P., TONISSI, L. B. POVH, J. A., SIROL, R. N., RIBEIRO, R. P. Crioprotetores para o resfriamento de embriões de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850). Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 35, n. 4, p. 2809-2816, 2014.

FREERE, R. H.; WEIBEL, E. R. Stereologic techniques in microscopy. Journal of The Royal Microscopical Society, v. 87, n. 1, p. 25-34, Jun. 1967.

Fricke, R.; Eschmeyer, W.; Fong J. D. GENERA/SPECIES BY FAMILY/SUBFAMILY IN: Eschmeyer's catalog of fishes. Eschmeyer's Catalog of Fishes. 2020. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>

FURUYA, W. M.; FURUYA, V. R. B.. Reprodução em peixes. In: MOREIRA, H. L. M.; Vargas, L.; Ribeira, R. P.; Zimmermann, S.. Fundamentos da Moderna Aquicultura. Canoas: Ulbra, 2001, p. 69-82.

GALO, J. M., STREIT-JUNIOR, D. P., SIROL, R. N., RIBEIRO, R. P., DIGMAYER, M., ANDRADE, V. X. L., EBERT, A. R. . Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. Braz. J. Biol., v. 71, n. 3, p. 693- 699, Aug. 2011.

GANECO, L. N.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; NAKAGHI, L. S. O. Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*. Zygote, v. 17, p.93-99, 2008.

GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O. Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. Acta Scientiarum: Biological Sciences, Maringá, v. 25, n.1, p.227- 231, 2003.

GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O.; URBINATI, E. C.; DUMONT-NET, R.; VASQUES, L. H. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon*

orbignyanus, durante o ciclo reprodutivo. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 27, n.2, p.131 - 138, 2001.

GARCIA, A. R.. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p.33-39, Jan./Mar. 2017.

GÉRY, J.; MAHNERT, V. Notes sur quelques Brycon des bassins de l'Amazonie, du Parana-Paraguay et du SudEst brésilien (Pisces, Characiformes, Characidae). Revue Suisse Zool., V.99, n.4, p. 793-819, 1992.

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

GODOY, M. P. Peixes do Brasil, Subordem Characoidei, Bacia do rio Mogi Guassu. Piracicaba: Editora Franciscana, 1975. 4 v

GONÇALVES, T. K.; AZEVEDO, M. A.; MALABARBA, L. R.; FIALHO, C. B. Reproductive biology and development of sexually dimorphic structures in *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae). Neotropical Ichthyology, v. 3, n. 3, p.433-438, Set. 2005.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. Amer. Zool. v.21, p. 345-357, 1981.

GRIER, H. J. Chordate testis the extracellular matrix hypothesis. The Journal of Experimental Zoology v.261, p.151-160,1992.

GRIER, H. J. Comparative Organization of Sertoli Cells Including the Sertoli Cell Barrier. In L. D. Russel, and M. D. Griswold (eds). The Sertoli cell, p. 704-730, 1993.

GRIER, H. J. The Germinal Epithelium: It's dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute v. 53, p. 537-552, 2002.

GRIER, H. J., URIBE, M. C., e PARENTI, L. R. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). Journal of Morphology. v. 268, p.293–310, 2007.

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, v. 8. p. 119-142, 2009.

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 v. 159, p.331-345, 1980.

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

GRIER, H. J.; VAN DER HURK, R.; BILLARD, R. Cytological identification of cell types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. *Cell Tissue Res.*, v. 257, p.491-496, 1989.

GRIER, H.J.; LO NOSTRO, F. The teleost germinal epithelium: a unifying concept. In: *Proceedings of the International Symposium on the Reproductive Physiology of fish*, 6. Begen. *Proceedings Begen: University of Bergen Press*, 233-236, 2000.

GRIER, J. H.; URIBE ARANZÁBAL, M. C. The Testis and Spermatogenesis in Teleosts. In: Jamieson, B. G. M. (Ed.): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes). Phylogeny, Reproductive System, Viviparity, Spermatozoa*, Science Publishers, Enfield, 2009, p.119–142.

HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, R. G. Piracema: por que os peixes migram. *Scientific American Brasil*, São Paulo, p. 76 – 80, Dez. 2008.

HUSZNO, J.; KLAG, J.. The reproductive cycle in the male gonads of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae). *Stereological analysis. Micron*, v. 43, n. 5, p. 666-672, abr. 2012.

INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS (IEF). Piracema. 2011. Disponível em: <http://www.ief.mg.gov.br/pesca/piracema#:~:text=O%20nome%20piracema%20vem%20do,p ara%20a%20subida%20ao%20rio>. Acesso em: 19 jan. 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Textos & Atlas*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 538.

KAVALCO, K. F. Estudos evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). 2008. 223 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências: Biologia-genética, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

LADD, A. A.; LADD, F. V.; SILVA, A. A.; OLIVEIRA, M. F.; SOUZA, R. R.; COPPI, A. A. SCG postnatal remodelling – hypertrophy and neuron number stability – in Spix's Yellow-toothed Cavies (*Galea spixii*). *Int. J Dev Neurosci*, v.30, n.2, p.129-37, 2012-

LADD, F. V.; LADD, A. A.; RIBEIRO, A. A.; COSTA, S. B.; COUTINHO, B. P.; FEITOSA, G. A.; ANDRADE, G. M.; CASTRO-COSTA, C. M.; MAGALHÃES, C. E.; CASTRO, I. C.; OLIVEIRA, B. B.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A.; ORIÁ, R. B. Zinc and glutamine improve brain development in suckling mice subjected to early postnatal malnutrition. *Nutrition*, n. 26, v. 6, p. 662-70, 2010.

LANGEANI, F.; CASTRO, R. M. C.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATTA, O. A.; PAVANELLI, C. S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, v.7, n.3, p.181-197, 2007.

LE GAC F, LOIR M. Male reproductive system, fish. In: Knobil E, Neill JD (eds) *Encyclopedia of reproduction*, vol 3. Academic Press, San Diego, p. 20–30, 1999.

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

LEIRA, M. H.; BOTELHO, H. A.; BARRETO, B. B.; SANTOS, H. C. A. S.; BOTELHO, J. H. V. Piracema: período de preservação dos peixes nativos. *Nutri Time, Revista Eletrônica*, v. 15, n. 03, p.8153-8163, Mai/Jun 2018.

LENIS-SUCERQUIA, G. A; CRUZ-CASALLAS, P. E; DAVID-RUALES, C. A. Reproducción inducida de la sabaleta *Brycon henni*: revisión bibliográfica. *Revista Lasallista de Investigación*, v. 12, n. 1, p. 211-220, 2015.

LIMA, F. C. T. *Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. *Ichthyol Explor Freshwaters*, v.15, p.279–287, 2004.

LIMA, F. C. T.; CASTRO, R. M. C. *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). *Ichthyol Explor Freshw*, v.11, n.2, p. 55-62, Abr. 2000.

LIMA, F.C.A. A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Muller & Troschel (Characiformes: Characidae). *Zootaxa*, v.4222, n.1, p.1-189, 2017.

LOIR, M.; SOURDAINE, P.; MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C.; JÉGOU, B. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc Res Tech*, v.32, n.6, p.533-552, 1995.

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. *Cienc. Inv. Agr., Santiago*, v. 36, n. 2, p. 191-208, Aug. 2009.

MACIEL, C. M. R. R. Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes (1849) (Charciformes, Characidae, Bryconinae). 2006. 229 p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 2006.

MADUREIRA, T. V.; ROCHA, M. J.; CRUZEIRO, C.; GALANTE, M. H.; MONTEIRO, R. A. F.; ROCHA, E. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the

Douro River estuary (Portugal): assessing impacts on gonadal maturation with a histopathological and stereological study of zebrafish ovary and testis after sub-acute exposures. *Aquatic Toxicology*, v. 105, n. 3-4, p. 292-299, out. 2011.

MANDERIM-DE-LACERDA, C. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: EURJ, 1995, p.131.

MARIA A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R.T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, v.260, p. 298-306, Set. 2006.

MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. In: IV CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2012, Fortaleza, CE, Brasil. *Ciência Animal*. Fortaleza: v.22, n.1, p.124-131, 2012.

MATTEI, X., SIAU, Y.; THIAW, O. T.; THIAM, D. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces Teleosteo). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish." *Journal of Fish Biology* v.43, p. 931-937,1993.

MOREIRA, A.B.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Fatty Acids Profile and Cholesterol Contents of Three Brazilian Brycon Freshwater Fishes. *Journal of Food Composition and Analysis*, San Diego, v.14, n. 6, p. 565-574, 2001.

MURGAS, L. D. S., FRANCISCATTO, R. T., SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 62, p.1810-1814, dez. 2003.

MURGAS, L. D. S., MILIORINI, A. B., FRANCISCATTO, R. T., MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. *R. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, Dec. 2004.

NAGAHAMA, Y. The Functional Morphology of Teleost Gonads. *Fish Physiology*. Academic Press, 1983.

NASCIMENTO, N. F.; SIQUEIRA-SILVAM D. H.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O.; YASUI, G. S. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. *Zygote*, v.25, n.4, p.537-544, Aug. 2017.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. *Fishes of the World*. 5. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2016. 707 p.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 197-206, 2009.

NUNES, D. M. F.; MAGALHÃES, A. L. B.; Weber, A. A.; Gomes, R. Z.; NORMANDO, F. T.; SANTIAGO, K. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Influence of a large dam and importance of an undammed tributary on the reproductive ecology of the threatened fish matrinxã *Brycon orthotaenia* Günther, 1864 (Characiformes: Bryconidae) in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 13, p. 317-324, 2015.

OLIVEIRA C.; AVELINO, G. S.; ABR, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTI, G.; VARI, R. P.; CORRÊA e CASTRO, R. M. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, v.11, p. 1-25, 2011.

OLIVEIRA, D. J.; ASHIKAGA, F. Y.; FORESTI, F.; SENHORINI, J. A. Indução a reprodução artificial e caracterização espermática da piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Bryconidae, Characiformes), espécie em perigo de extinção. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, v.5, n.2, p.10-19, Ago – Dez. 2014.

OLIVEIRA, D.J.; ASHIKAGA, F.Y.; FORESTI, F.; SENHORINI, J.A. Conservation status of the “Piracanjuba” *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes, Bryconidae): basis for management programs. *Biodiversidade Brasileira*, v.7, n.1, p.18-33, 2017.

PARENTI, L. R.; GRIER, H. J. Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes. *Integrative and Comparative Biology*, v. 44, n. 5, p.333-348, Nov. 2004.

PEREIRA, T. M. Efeito da época da indução hormonal sobre a qualidade da desova em matrinxã (*Brycon amazonicus*). 2012. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2012.

PEREIRA, T. N. A.; CASTRO, R. M. C. The brain of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Teleostei: Characiformes: Bryconidae): gross morphology and phylogenetic considerations. *Neotropical Ichthyology*, v. 14, n. 3, 2016.

PLÖEN, L.; COURTENS, J. Comparative aspects of mammalian spermiogenesis. *Scann. Electron Mic.*, v.2, p.639-652, 1986.

POSTINGEL-QUIRINO, P.; RODRIGUES, M. S.; CABRAL, E. M. S.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; MORI, R. H.; BUTZGE, A. J.; NÓBREGA, R. H.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. The influence of increased water temperature on the duration of

spermatogenesis in a neotropical fish, *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). Fish Physiol Biochem, p.1-9, Set. 2020

PUDNEY J. Comparative cytology of the Leydig cell. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds) The Leydig cell. Cache River Press, Vienna, IL, 1996, p 98–142.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. Microscopic Research Techniques v.32, p.459-497, 1995.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I; ANTONELI, F. N.; OLIVEIRA, C.. Spermiogenesis and sperm ultrastructure in *Cichla intermedia* with some considerations about Labroidei spermatozoa (Teleostei, Perciformes, Cichlidae). Tissue & Cell. Edinburgh: Churchill Livingstone, v. 35, n. 6, p. 441-446, 2003.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I; OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI, A. E. The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. Journal of Fish Biology, v.58, p. 1623-1632, 2001.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I; WILDNER, D. D.; ISHIBA, R. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.37, n.2, p.181-191, abr./jun. 2013.

QUIROS, R. The Parana River Basin development and the changes in the lower basin fisheries. Interciência, v.15, p.442–451, 1990.

RATTY, F. J.; LAURS, R. M.; KELLY, R. M. Gonad Morphology, Histology, and Spermatogenesis in South Pacific Albacore Tuna *Thunnus alalunga* (Scombridae). Fishery Bulletin, U.S. Ss, p. 207-2016. set. 1990.

REECE J. B.; URRY, L. A.; CAIN, M. L.; WASSERMAN, S. A.; MINORSKY, P. V.; JACKSON, R. B. Biologia de Campbell. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 1488 p. REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONES, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. Journal of fish biology, v.89, p.12-47, 2016

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr. CJ. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA). Porto Alegre: EDIPUCRS. 2003.

RIBEIRO, A. A. C. M.; DAVIS, C.; GABELLA, G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse. Anatomy and embryology, v. 208, n. 5, p. 367-80, 2004.

RIBEIRO, A. A. Size and number of binucleate and mononucleate superior cervical ganglion neurons in young capybaras. Anat Embryol, v. 211, p. 607-617, 2006.

RODRIGUES, M. S.; SIQUEIRA-SILVA, D. H. de; QUIRINO, P. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.. The efficiency of spermatogenesis and the

support capacity of Sertoli cells in Characiformes. *Theriogenology*, v. 103, p. 149-152, Nov. 2017.

RODRIGUES, M. S.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; QUIRINO, P. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Spermatogenesis in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: a histological analysis with emphasis to spermatogonial and spermatid types. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v.41, p. 697 – 705, 2015.

RODRIGUES, M. V. Contribuição genética e reprodutiva de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e extrusão. 2015. 40 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. editor. Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna brasileira. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 2008.

SCHULZ, R. W.; DE FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. General and comparative endocrinology, v.165, n.3, p.390-411, 2010.

SCHULZ, R. W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; VILELA, D.A.R.; GODINHO, H. P. Sertoli Cell Proliferation in the Adult Testis—Evidence from Two Fish Species Belonging to Different Orders. *Biology of Reproduction*, v. 73, n. 5, p. 891-898, Nov. 2005.

SCHULZ, R.W., MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*. v.26, p.43–56, 2002. SILVA, J. E. Migração de Peixes. Disponível em: <<http://www.fontedosaber.com/biologia/migracao-de-peixes.html>> Acesso em: 18 de janeiro de 2020

SOUTO, C. N.; FARIA, T. M.; OLIVEIRA, H. F.; ROSA, R. M.; SILVA, L. A. S.; CAMPOS, M. A. F. Visão geral sobre reprodução de peixes teleósteos: da anatomia à sinalização molecular. *Pubvet*, v.11, n.11, p.1175-1187, Nov. 2017.

TRAVERNIZOLI, N.M.; SILVA, P. C.; SANTOS, U.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, C.; DERGAM, J. A. Cytogenetic and Molecular Data Demonstrate that the Bryconinae (Ostariophysi, Bryconidae) Species from Southeastern Brazil Form a Phylogenetic and Phylogeographic Unit. *Plos One*, v. 10, n. 9, p.1-18, 2015.

VAN LOOK, K.J.W.; KIME, D.E. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm, *Journal of Fish Biology*, v.63, p.1020-1033, 2003.

VARI, R.P. (1998). Higher level phylogenetic concepts within characiforms (Ostariophysi), a historical review. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil, 1998.

VASQUES, R. OR.; COUTO, E. C. G. Percepção os pescadores quanto ao estabelecimento do período de defeso da pesca de arrasto para a região de Ilhéus (Bahia, Brasil). Revista da Gestão Costeira Integrada, v.11, n.4, p.479-485, 2011.

VAZ, M.M.; TORQUATO, V.C.; BARBOSA, N. D. C. Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande. Belo Horizonte, CEMIG/CETEC. 2000, 144p.

VAZZOLER A. E. A. M., Menezes N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). Rev Bras Biol, v.52, p.627-640, 1992.

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

VAZZOLER, A. E. A. M., SUZUKI H. I., MARQUES E. E., LIZAMA M. de Los A. P. Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução. In Vazzoler, A. E. A. de M., A. A. Agostinho and N. S. Hahn (Eds.). A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá, Paraná. EDUEM, 1997, 249–265 p.

VENTURIERI, R. L. L.; BERNARDINO, G.. O uso de hormônios na reprodução artificial de peixes. Revista Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro, v. 9, n. 55, p. 39 - 48, Jun. 1999.

VIGOYA, A. A. A. Transplante de espermatogônias tronco em peixes teleósteos, utilizando como modelo experimental a carpa comum (*Cyprinus carpio*). 2016. 102 f. Tese (Doutorado) - Curso de Aquicultura, Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2016.

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

WEIBEL, E. R.; GOMEZ, D. M. A principle for counting tissue structures on random sections. Journal of applied physiology, v. 17, n. 2, 343-348, 1962.

WINEMILLER, K. O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. Oecologia, Berlin, v. 81, n. 2, p. 225-241, 1989.

LOWE-MCCONNELL, R.H. 1999. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo, EDUSP, 584p.

YASBECK, G. M.; OLIVEIRA, R. S.; RIBEIRO, J. M.; GRACIANO, R. D.; SANTOS, R. P.; CARMO, F. M. S.; LAVENIER, D. A broad genomic panel of microsatellite loci from *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Bryconidae) an endangered migratory Neotropical fish. Scientific, v. 8, n. 85, 1-5, 2018.

ZANIBONI FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. AND MEURER, S. 2000. Monitoramento e manejo da ictiofauna do alto rio Uruguai – Espécies migradoras. Relatório final, Gerasul, Florianópolis, SC, 54 p.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.367-373, 2007.

ZANIBONI-FILHO, F. E. & SCHULZ, U. H. Migratory fishes of the Uruguay River. Pp. 157- 194. In: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C.; Baer, A. (Eds.) Migratory fishes of South America: biology, fisheries, and conservation status. Victoria, Canada: World Fisheries Trust/IDRC/World Bank, 2003, 372p.

ZARDO, E. L. Diferenciação sexual, estrutura populacional e ciclo reprodutivo de piracanjubas (*Brycon orbignyanus*) sob condições de cultivo: “Espermatogênese e ciclo reprodutivo de machos de *Brycon orbignyanus* em condições de cultivo. 2018. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

ZOHAR Y, MUÑOZ-CUETO J, ELIZUR A, KAH O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. Gen Comp Endocrinol, v.165, p.438-455, 2010.

OBJETIVOS

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, é uma espécie reofílica muito importante na pesca profissional, na ecologia e na aquicultura, porém está ameaçada em algumas regiões do Brasil, e estudos que esclareçam a dinâmica da reprodução desses animais são essenciais para sua conservação. Neste sentido, o estudo teve por objetivo compreender a cinética da espermatogênese por meio de análises quantitativas (estereológica) das interações das células germinativas e somáticas na obtenção de informações do número de gerações espermatogônias, magnitude da perda de células germinativas, capacidade de suporte das células de Sertoli, diâmetro nuclear dos diferentes tipos celular, além do rendimento meiótico e rendimento espermatogênico em *B. orbignyanus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o número de células germinativas e células de Sertoli para cada tipo de cisto espermatogênico;
- Verificar a capacidade de suporte das células de Sertoli;
- Prover informações do número de gerações espermatogônias;
- Dimensionar as perdas de células germinativas (morte celular) durante a espermatogênese;
- Estimar o rendimento espermatogênico e o índice meiótico.
- Definir o diâmetro nuclear das células germinativas

**Análise estereológica da espermatogênese em *Brycon orbignyanus*
(Characiforme: Bryconidae)**

Cristiane Fernanda Benevente^{a,b}, Patrícia Postingel-Quirino^{a,b}, Luciane Gomes-Silva^{a,b},
Maria Luiza Ribeiro Delgado^{a,b}, Guilherme Antônio de Freitas^c, Alexandre Ninhaus-Silveira^a,
Rosicleire Veríssimo-Silveira^a

Artigo apresentado de acordo com as normas da revista Theriogenology

^aUNESP –Univ. Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira,
Departamento de Biologia e Zootecnia, L.I.NEO - Laboratório de Ictiologia Neotropical, São
Paulo, Brasil

^bUNESP –Univ. Estadual Paulista, Campus de Botucatu,
Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), São Paulo, Brasil

^c AES Tietê, Rodovia Transbrasiliana (BR153), Km 139, 16370-000, Promissão, São
Paulo, Brasil

Corresponding author: Rosicleire Veríssimo Silveira – PhD - UNESP – Univ.
Estadual Paulista, Campus of Ilha Solteira, Pos-Graduation Program in Biological Sciences
(Zoology) - Laboratory of Neotropical Ichthyology (LINEO), Ilha Solteira, São Paulo, Brazil.
Zip code: 15385000. Phone: +55 (18) 3743-1935. E-mail address:
rosicleire.verissimo@unesp.br

E-mail addresses: benevente.cristiane@gmail.com; patipostingel@gmail.com;
luciane.gomess@outlook.com.br; mluizardelgado@hotmail.com; guilherme.freitas@aes.com;
aleninhaus@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A reprodução é de suma importância para a perpetuação das espécies e um elemento crítico para o sucesso evolutivo [1-3]. Em particular, nos vertebrados, o processo de formação dos gametas nas fêmeas é conhecido como oogênese e, nos machos de espermatogênese. Nos teleósteos, a espermatogênese ocorre dentro dos túbulos seminíferos, e todo o desenvolvimento das células germinativas ocorre dentro de cistos formados pelas projeções citoplasmáticas da célula de Sertoli [5-6]. A espermatogênese é influenciada por fatores exógenos como temperatura, fotoperíodo e precipitações pluviométricas, este último sendo o mais importante para espécies reofílicas, e, tais sinais são capturados por órgãos sensoriais, processados e convertidos em mensagens neurais, assim, desencadeando eventos fisiológicos que conduzirão a reprodução bem-sucedida [7-10].

Estudos que abordam a fase reprodutiva de peixes, estão voltados, em sua maioria, para os aspectos morfológicos da espermatogênese e pouco estudos abordam a análise estereológica [11-14]. Para *Brycon orbignyanus* não é diferente, há dados sobre a espermatogênese do animal, tanto em cativeiro quanto em vida livre, abordando aspectos morfológicos e ultra estruturais de diferentes aspectos das células germinativas [15-17]. Entretanto, um aspecto que pode ser abordado para avaliação da espermatogênese é a possível quantificação das interações celulares entre espermatogônias, espermatócitos, espermátides e células de Sertoli, de modo que tais quantificações esclareçam informações sobre o número de gerações espermatogônias e o rendimento das divisões celulares, estimando a perda de células ao longo do processo, além de estimar a capacidade de suporte das células de Sertoli [18-22].

Considerando que a piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, é uma espécie que se destaca devido ao seu alto interesse ecológico, por ser uma espécie ameaçada de extinção, além de grande apelo comercial na aquicultura, pois é considerada uma carne nobre e muito apreciada e, em meio natural, considerado um bioindicador ambiental, devido a sua sensibilidade a alterações ambientais [23-25], o presente estudo tem por objetivo avaliar a espermatogênese de *B. orbignyanus* por meio da análise estereológica. Assim possibilitando melhor interpretação das interações existentes entre células somáticas, células germinativas e elementos intersticiais presentes no compartimento testicular, determinando o número de células germinativas e células de Sertoli para cada tipo de cisto espermatogênico, o número de gerações espermatogônias, a magnitude da perda de células germinativas durante a espermatogênese, o rendimento meiótico e, por fim, a eficiência das células germinativas.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. ÉTICA

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Ictiologia Neotropical -Lineo, UNESP/FEIS, aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UNESP sob o protocolo N°12/2017

2.2. ANIMAIS E PROTOCOLOS

Foram utilizados 5 exemplares de machos de *Brycon orbignyanus*, com um ano de idade, com $24 \pm 2,07$ cm de comprimento médio, criados em cativeiro na Estação de Aquicultura da Usina Hidrelétrica Mário Lopes Leão, A.E.S - Tietê, em Promissão-SP ($21^{\circ} 17' 49''$ S, $49^{\circ} 47' 0''$ W), em conjunto com a empresa Big Peixe LTDA-ME.

Os animais foram anestesiados com 0,5g de benzocaína dissolvida em uma solução de 5 ml de etanol absoluto e 2 L de água. Após anestesiados, uma incisão ventral no sentido póstero-anterior expondo a cavidade abdominal foi realizada, para assim, os testículos serem retirados e fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen (0,1 M, pH 7,4), por pelo menos 24 h. Os testículos foram desidratados em solução alcoólica, em série crescente de concentração (70 % e 95%) e incluídos transversalmente em glicol metacrilato. Posteriormente microtomados em cortes seriados a $3,0 \mu\text{m}$ (Fig. 1) de espessura no micrótomo (LEICA® RM 2145, Leica Instruments GmbH, Heidelberg Nussloch, Alemanha) equipado com navalha de vidro. Os cortes seriados foram numerados para facilitar a visualização da sequência para a análise estereológica. O material foi corado em hematoxilina e eosina (HE). A análise microscópica foi realizada com o uso do microscópio óptico Olympus® e o fotoprocessamento pela câmera digital MOTIC® (Moticam 2300 CCD, 3.0 M. pixel) acoplada ao microscópio.

2.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para realização da adequação da nomenclatura e redescrição das células germinativas de *B. orbignyanus*, avaliamos, com o auxílio de um microscópio de luz, a morfologia de cada tipo celular, com base nas características nucleares e tamanho nuclear.

2.4. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

Foram contabilizadas as seguintes células germinativas: espermatogônia indiferenciada (Spg Aind), cistos de espermatogônias diferenciadas (Spg Adif), espermatogônias B (Spg B), espermatócitos primários em leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P) e as espermátides iniciais (E1), intermediárias (E2) e finais (E3), bem como as células de Sertoli (célula somática). O diâmetro de 100 núcleos celulares, de cada tipo de célula germinativa, foi mensurado utilizando-se o programa Motic Images Plus 2.0.

Para a quantificação de um determinado tipo celular, um corte foi escolhido de modo aleatório dentro da sequência de cortes seriados realizada anteriormente. Por exemplo, o corte de número 15 foi selecionado e analisado e, novamente, de forma aleatória, um cisto íntegro foi escolhido para ser quantificado. No corte seguinte, o de número 16, tem o mesmo cisto contado e, o mesmo acontecerá com os cortes seguintes, até o término do cisto. Posteriormente, volta-se para o corte de início (15) e o cisto será contado para trás (14, 13, 12, 11...) até o começo do cisto, de modo a contabilizar o cisto como um todo (Figs. 1 e 2).

Desta maneira, foram contabilizados cinco cistos por animal, de cada tipo celular mencionado e as células de Sertoli [19 e 23]. Todos os cistos selecionados apresentaram uma clara delimitação das células de Sertoli.

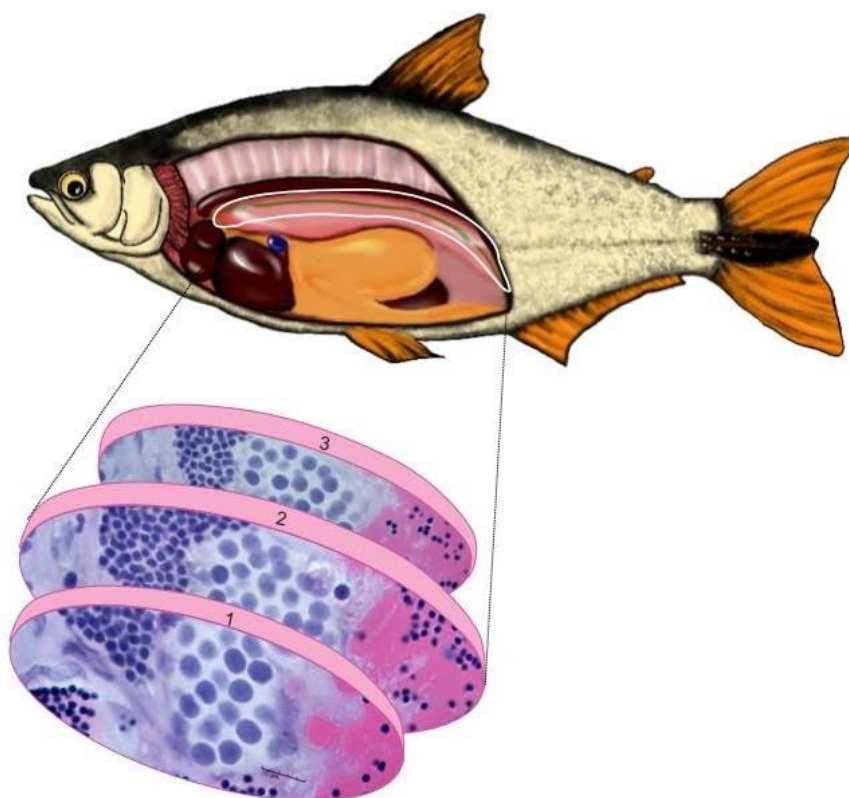


Figura 1: Exemplo de cortes seriados em *Brycon orbignyanus*. Fonte: Figura modificado de Oliveira, 2021.

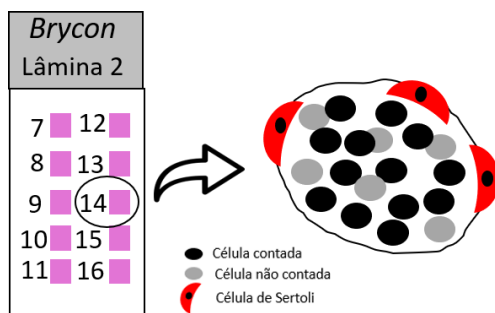


Figura 2: Contagem das células germinativas no cisto espermatogênico. Modificado de Rodrigues et al., 2017.

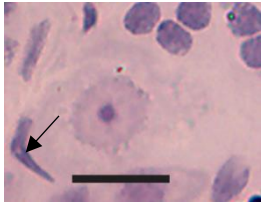
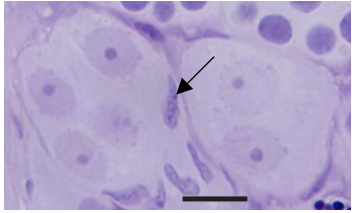
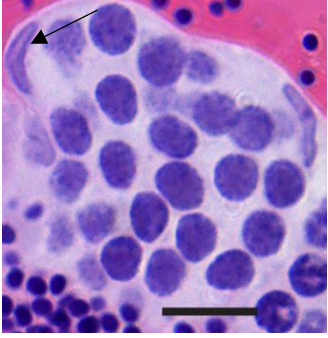
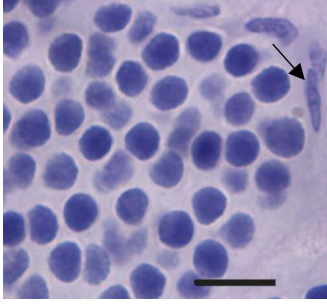
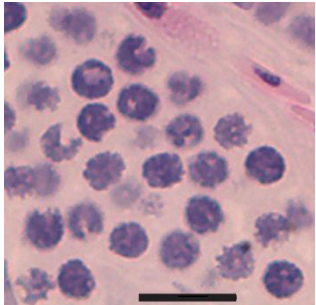
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Assim que as premissas necessárias para estatística paramétrica foram testadas e certificadas, os dados foram testados utilizando ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($P < 0.05$), através do software gratuito BioEstat (Instituto Mamirauá). Todos os dados são expressos através da média $\pm$ desvio padrão.

3. RESULTADOS

MORFOLOGIA DAS CÉLULAS GERMINATIVAS

Para a realização das contagens estereológicas inicialmente foram identificados os estágios e caracterização das seguintes células germinativas: espermatogônia indiferenciada; espermatogônias diferenciadas A e B, espermátócitos em leptóteno/zigóteno e paquíteno, além de três tipos de espermátides, divididas em inicial, intermediária e final (Tab. 1).

TIPOS CELULARES	DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA	CÉLULAS GERMINATIVAS
Espermatogônia A indiferenciada (Spg Aind)	Encontradas isoladas. A maior célula do epitélio germinativo ($8,5 \pm 0,79 \mu\text{m}$). Núcleo com contorno irregular e nucléolo bem demarcado e evidente (Tab. 2).	
Espermatogônia Adiferenciada (Spg Adif)	Apresenta um núcleo bem delimitado é mais basófilo e menor ($5,9 \pm 0,72 \mu\text{m}$) que a anterior, nucléolo bem evidente (Tab. 2).	
Espermatogônia B (Spg B)	Último tipo espermatogonial, apresentando um núcleo basófilo enucleólos dispersos. Células com formato mais arredondado que as anteriores, citoplasma escasso e aumento na quantidade de material heterocromático. Diâmetro nuclear atinge $4,9 \pm 0,15 \mu\text{m}$ (Tab. 2).	
Leptóteno/zigóteno (L/Z)	Primeiro tipo celular dos espermatócitos primários, originados a partir da diferenciação das Spg B. Exibem núcleos arredondados, bem delimitados e cromatina condensada, não há presença de nucléolos nesta fase. As células nesta fase apresentam um diâmetro nuclear de $4,3 \pm 0,33 \mu\text{m}$ (Tab. 2).	
Paquíteno (P)	Os cromossomos estão mais evidentes, devido a condensação e espiralização adiantada da cromatina. Apresentam um diâmetro nuclear de $3,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Tab. 2).	

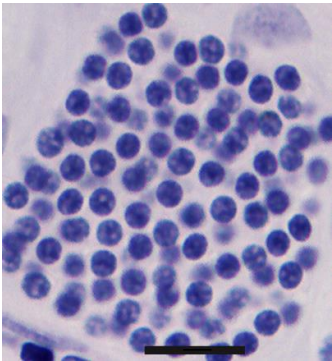
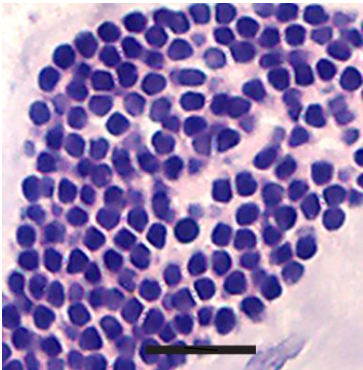
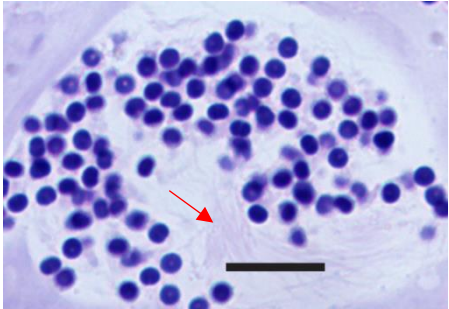
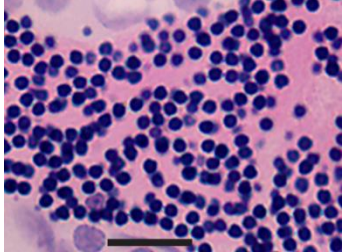
Espermátides inicial (E1)	Originadas da divisão meiótica dos espermatócitos secundários. Nesta fase, os núcleos apresentam uma aparência mais arredondada e condensado. As células estão mais comprimidas no cisto e apresentarem um diâmetro nuclear de $2,15 \pm 0,11 \mu\text{m}$ (Tab. 2).	
Espermátides intermediária(E2)	Apresentam um núcleo redondo e basófilo, possui um grau de compactação maior que a anterior. O diâmetro nuclear $2,05 \pm 0,13 \mu\text{m}$ (Tab. 2).	
Espermátides final (E3)	Última fase das espermátides. São as menores células da espermiogênese, seu núcleo está basófilo com um diâmetro nuclear de $1,45 \pm 0,1 \mu\text{m}$, as células dentro do cisto germinativo estão mais espaçadas, em virtude da formação do flagelo e a eliminação de resíduos citoplasmáticos (Tab. 2).	
Espermatozoide (SZ)	Presentes na luz do túbulo seminífero, já estão totalmente formados, apresentando um núcleo denso. Possuem um diâmetro nuclear de $1,5 \pm 0,12 \mu\text{m}$ (Tab. 2).	

Tabela 1: Descrição morfológica das células germinativas da espermatogênese de *Brycon orbignyanus*. Seta preta: Célula de Sertoli, Seta vermelha: flagelos. Hematoxilina e eosina. Barra de escala: 20 μm

ESTEREOLOGIA

Ao longo da espermatogênese houve aumento do número das células germinativas nos cistos e, conseqüentemente, um aumento das células de Sertoli por cisto (Tab. 2 e Fig. 3). Por meio de sucessivas divisões mitóticas, uma única espermatogônia A indiferenciada (Spg Aind) deu origem ao cisto de espermatogônia A (Spg Adif), com 8 células e, posteriormente, ao cisto de espermatogônia B (Spg B), contendo aproximadamente 451 células no cisto (Tab. 2 e Fig. 3), ocorrendo o primeiro grande aumento no número de células germinativas. Nesta fase espermatogonial, ocorreram em torno de 9 divisões mitóticas e, avalia-se que ocorreu uma perda celular de aproximadamente 12% no número de espermatogônias, já que o número esperado era de 512 células no cisto ($2^9 = 512$, sendo 9 o número de divisões mitóticas).

Ao fim das divisões mitóticas, as Spg B diferenciam-se em espermatócitos primários. Os espermatócitos primários quantificados foram os cistos em leptóteno/zigóteno (L/Z) e paquíteno (P). O cisto de espermatócitos em L/Z continuam cerca de 352 células e o cisto de P, continham cerca de 349 células germinativas, tendo uma perda celular menor que 1% de um tipo celular para o outro, assim, não mostrando diferença significativa na quantidade de células germinativas quando comparado os dois cistos de espermatócitos (Tab. 2 e Fig. 3). Entretanto, a perda celular que houve de Spg B (451 células) para L/Z (352 células), foi de aproximadamente 22%.

Após as duas divisões meióticas (a equacional e a reducional) nos espermatócitos, os mesmos, originam as espermátides, que nesta espécie, foram diferenciadas em três tipos. Inicialmente, no cisto de espermátide inicial (E1) o número de células é de aproximadamente 1.216, indicando um aumento de 71% no número de células germinativas, ao compara-la com o cisto de espermatócito em P. Tal aumento indica a dinâmica natural do processo de espermatogênese, no qual uma célula diploide origina quatro células haploides. Nos cistos de espermátides intermediárias (E2), observamos uma diminuição no número de células germinativas, 1.204 células, entretanto, não mostra diferença significativa com E1. No entanto, esse decréscimo no número de células germinativas continua no cisto de espermátide final (E3), no qual apresente aproximadamente 1.190 células. Ao comparar o número final de células germinativas com o cisto de E1, temos uma perda celular de aproximadamente 2,2%, mostrando assim, uma diferença estatística significante entre estes dois tipos celulares (Tab. 2 e Fig. 3).

Frente aos dados obtidos a respeito dos números das células germinativas por cisto, obteve-se um rendimento espermatogênico próximo a 58% (E3 obtidas/ E3 esperadas) e, o índice meiótico de aproximadamente 3,3 (E3/L/Z).

CAPACIDADE DE SUPORTE DAS CÉLULAS DE SERTOLI

No decorrer da espermatogênese há um aumento das células germinativas nos cistos, fato este que, reflete no número de células de Sertoli e em sua capacidade de suporte.

Na fase espermatogonial, inicialmente há apenas 1 célula de Sertoli em Spg Aind, aumentando, para 4 células nos cistos de Spg Adif, chegando a 7 células de Sertoli nos cistos de Spg B. Deste modo, há um aumento de 7 vezes no número de célula de Sertoli/cisto na fase mitótica, chegando a um suporte celular de aproximadamente 65 células germinativas para cada célula de Sertoli (Tab. 2 e Fig. 3)

Nos cistos de espermatócisto L/Z, apesar da redução no número de células germinativas, houve um aumento significativo no número células de Sertoli, atingindo 9 células de Sertoli no cisto, com um suporte celular com cerca de 38 células. Entretanto, quando comparados os cistos de espermatócitos L/Z com os cistos de P, houve um aumento de 1 célula de Sertoli e a capacidade de suporte diminuiu para 36 células. Apesar desse aumento, não houve diferenças estatísticas nesses índices quando comparados os dois tipos celulares (Tab. 2 e Fig. 3).

O mesmo foi observado quanto os diferentes cistos de espermátides, em relação as células de Sertoli envolvidas nos cistos não houve diferença significativa em nenhuma das três fases. Tanto E1e E2 apresentaram uma média de 14 células de Sertoli por cisto, tendo uma queda para 13 células de Sertoli por cisto em E3 (Tab. 2 e Fig. 3). Em E3, o suporte celular da célula de Sertoli foi aproximadamente 89 células (Tab. 2 e Fig. 3). Quando comparado o número de células de Sertoli no cisto de E3 com o cisto de P, houve um aumento de 24% de células de Sertoli e um aumento de 60% na capacidade suporte dessas células.

Tipos celulares	Células germinativas por cisto	Diâmetro nuclear (μm)	Células de Sertoli por cisto	Suporte da célula de Sertoli
Spg Aind	1 ± 0^a	8.5 ± 0.79^a	1 ± 0.51^a	1 ± 0.25^a
Spg Adif	8 ± 0.7^a	5.9 ± 0.72^b	4 ± 0.5^b	1.75 ± 0.26^a
Spg B	451 ± 15.52^b [512]	4.9 ± 0.15^c	7 ± 0.48^c	65.14 ± 4.93^b
L/Z	352 ± 9.84^c [512]	4.3 ± 0.33^d	9 ± 0.56^d	38.44 ± 5.54^c
P	349 ± 8.19^c [512]	3.9 ± 0.3^e	10 ± 0.51^d	36.2 ± 2.17^c
E1	1216 ± 28.6^d [2048]	2.15 ± 0.11^f	14 ± 0.5^e	90.07 ± 3.28^d
E2	$1204 \pm 31.7^{d,e}$ [2048]	2.05 ± 0.13^f	14 ± 0.48^e	88 ± 4.54^d
E3	1190 ± 32.3^e [2048]	1.45 ± 0.1^g	13 ± 0.51^e	89.57 ± 4.46^d
Sz	-	1.5 ± 0.12^g	-	-

Tabela 2: Análise estereologia de células germinativas em *Brycon orbignyanus*. Spg Aind – Espermatogônia A indiferenciada; Spg Adif – Espermatogônia A diferenciada; Spg B – Espermatogônia B; L/Z – Espermatócito em leptóteno/zigóteno; P – Espermatócito em paquíteno; E 1 – Espermatíde inicial; E 2 – Espermatíde intermediária; E 3 – Espermatíde final; Sz – Espermatozóide. a-g letras diferentes indicam valores médios significativamente diferentes ($P < 0,05$).

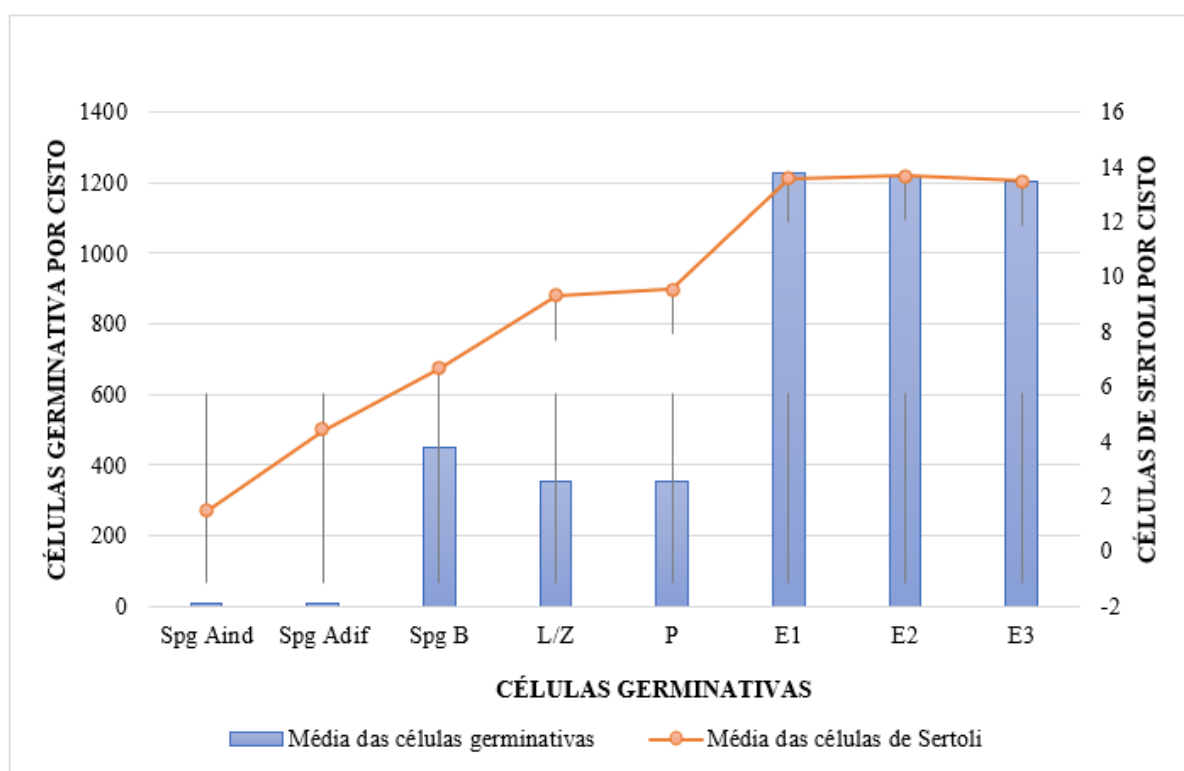


Figura 3: Comparação do número de células germinativas com a quantidade de células de Sertoli por cisto. Spg Aind: Espermatogônia A indiferenciada; Spg Adif :Espermatogônia A diferenciada; Spg B: Espermatogônia B; L/Z: Espermatócito em leptóteno/zigóteno; P: Espermatócito em paquíteno; E1: Espermatíde inicial; E2: Espermatíde intermediária; E3: Espermatíde final; Sz: Espermatozóide. Fonte: Própria autora

4. DISCUSSÃO

A espermatogênese é um processo complexo, organizado e conservativo nos vertebrados, deste modo, conhecer a morfologia e funções das células germinativas é uma importante ferramenta para um melhor entendimento da regulação espermatogênese [20-26].

Para tal, a principal função relacionada a espermatogônias Aind, também conhecida por célula-tronco, é o repovoamento celular [5,27]. Resultante da divisão mitótica, as espermatogônias diferenciadas A e B, são encontradas em cistos e interconectadas por pontes citoplasmáticas, que proporcionam o desenvolvimento sincrônico das células [5]. O número de divisões mitóticas observadas em *B. orbignyanus* é semelhante ao descrito para *A. altiparanae* com cerca de nove gerações espermatogoniais [19], diferente do que foi visto para *Hoplias*

malabaricus, espécie pertencente a mesma ordem da espécie aqui estudada, foi estimado oito gerações espermatogônias [28], para espécies *Danio rerio* e *Cyprinus carpio* (Vigoya, 2016), da ordem Cypriniformes, Como observado, não é possível determinar que as gerações espermatogônias estejam relacionadas com a ordem das espécies, mostrando que esse número é de caráter espécie-específico [29].

A fase seguinte da espermatogênese, a fase meiótica, acontece a partir de um processo de diferenciação das Spg B, esta fase é dividida em espermatócito primário e secundário, no qual, células diploides dão origem a células haploides. Nesta fase, a contagem estereológica ocorre nos cistos de leptóteno/zigóteno e paquíteno, somente na espécie *O. niloticus* há um pequeno aumento de células germinativas de um cisto para o outro [32], já para as espécies *B. orbignyanus*, *A. altiparanae* e *D. rerio* há perda celular [19,20].

Por fim, no processo espermiogênico, originados ao fim da fase meiótica, identificamos três tipos de espermátides para *B. orbignyanus*, semelhante a outras espécies de peixes teleósteos [5,8,14,19-20,32,]. A diferenciação entre os três tipos celulares aconteceu com base na condensação nuclear e no tamanho do diâmetro nuclear [5,29]. Ao fim desta fase, a partir do índice meiótico junto com o rendimento espermatogênico obtemos a eficiência da espermatogênese, com base nesse entendimento, é possível evidenciar a perda celular que ocorreu durante a espermatogênese [8,19-20,29]. Na espécie estudada, o rendimento espermatogênico foi de 58%, evidenciando uma perda celular de 42% de células germinativas, em *D. rerio* o rendimento espermatogênico foi maior, atingindo 62% - com 38% de perda celular- com um índice meiótico de 3,1 [20], entretanto, para *O. niloticus* o rendimento espermatogênico atingiu 60% - 30% de perda celular- com um índice meiótico de 2,7 [32]. O processo de perda celular é um processo normal da espermatogênese, ocorrendo em todas as fases do desenvolvimento celular, ainda podendo ter relação com o suporte de células de Sertoli [8].

Com o aumento do cisto germinativo no decorrer da espermatogênese, há um aumento significativo no número de células de Sertoli, assim, evidenciando que as células de Sertoli são outro fator importante no sucesso da espermatogênese [33]. Pois, as células de Sertoli, estão anexadas nos cistos germinativos, delimitando-os e, assim, limitando o número de células germinativas presentes no cisto [34-35], além de ser responsável pela nutrição [34,36], suporte hormonal – sintetiza esteroides, FSH e testosterona- [37-39] e fagocitose de resíduos [35,40].

Nos mamíferos, assim como nos peixes, as células de Sertoli desempenham o mesmo papel morfológico e funcional, entretanto, o número de células de Sertoli nos mamíferos é definido ainda na puberdade, após a esse valor estabelecido, não há mais divisões [33,41], em

contrapartida, nos peixes, o número de células de Sertoli aumenta conforme o desenvolvimento do cisto germinativo [20-21,26,32-33], como podemos ver nas espécies *D. rerio* [20], *P. reticulara* [42], por Vigoya (2016) em *Cyprinus carpio* e *B. orbignyanus*, o número de células de Sertoli por cisto aumenta progressivamente no decorrer da espermatogênese, cessando apenas na espermiogênese (espermatíde intermediária), no entanto, em *O. niloticus* [8,32] e *A. altiparanae* [19], o número de células de Sertoli também teve um aumento progressivo, porém, seu aumento cessou na fase de espermátócitos, mostrando uma queda na espermiogênese.

A justificativa de ocorrer um aumento no número de células de Sertoli na fase meiótica e, permanecer em muitos casos na espermiogênese, pode estar relacionado complexidade desta fase, no qual, células germinativas diploides sofrem divisões nucleares e recombinação genética, para se tornarem células germinativas haploides e assim, aumentando o número de células dentro do cisto e consequentemente, carecendo de mais célula de Sertoli para apoiar o cisto [29,43].

Em resumo, este estudo foi o primeiro a abordar a análise estereológica para a espermatogênese de machos de *B. orbignyanus*, exibindo assim, a complexidade dos eventos presentes, avaliando o suporte celular das células de Sertoli, índice meiótico e mitótico, eficiência espermatogênica e por fim, o crescimento das células germinativas assim, trazendo um melhor entendimento sobre os eventos que compõem a espermatogênese. Sendo, um dos poucos estudos nessa área para peixes. Frente a isso, a análise estereológica é de suma importância para estudos descritivos da espermatogênese, devendo ser utilizada em outras espécies de peixes. Além de propor uma adequação da nomenclatura e redescrição das características morfológicas das células germinativas presentes na espermatogênese.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Souza AF, Costa SGAL, Morais DB, Molina WF. Diversidade morfológica dos órgãos copulatórios dos vertebrados: uma revisão. *Biota Amazônia*. 2014; 4:114-22. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n4p115-123>
- [2] Pough FH, Janis CM, Heiser JB. *A vida dos Vertebrados*. São Paulo: Atheneu Editora; 2008.
- [3] Barreto CG, Braz VS, França FGR. Lições para a Biologia da Conservação no Cerrado a partir dos Padrões de Diversidade Genética Populacional do Anfíbio *Physalaemus cuvieri*. *Fronteiras: J. Soc., Technol. Environ. Sci.* 2016; 5: 101 - 19. <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2016v5i3.p101-119>

- [4] Grier HJ. Cellular Organization of the Testis and Spermatogenesis in Fishes. *Am Zool*, 1981; 21(2): 345-357. <https://doi.org/10.1093/icb/21.2.345>
- [6] Vazzoler AEAM. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e Prática*. Maringá: Eduem; 1996.
- [7] Venturieri, RLL, Bernardino G. O uso de hormônios na reprodução artificial de peixes. *Revista Panorama da Aquicultura*. 1999; 9(55): 39-48.
- [9] Zohar Y, Muñoz-Cueto JÁ, Elizur A, Kah O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2010; 165: 438-455. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017>
- [10] Souto CN, Faria TM, Oliveira HF, Rosa RM, Silva LAS, Campos MAF. Visão geral sobre reprodução de peixes teleósteos: da anatomia à sinalização molecular. *Pubvet*. 2017; 11(11): 1175-1187. <http://dx.doi.org/10.22256/PUBVET.V11N11.1175-1187>
- [11] Postingel-Quirino P, Rodrigues MS, Cabral EMS, Siqueira-Silva DHD, Mori RH, Butzge AJ, Nóbrega RH, Ninhaus-Silveira A, Veríssimo-Silveira R. The influence of increased water temperature on the duration of spermatogenesis in a neotropical fish, *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Fish Physiol. Biochem.* 2020; 9. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-020-00869-7>
- [12] Chagas JMA, Ninhaus-Silveira A, Veríssimo-Silveira R. Ciclo testicular de *Devario aequipinnatus* (Teleostei, Cyprinidae): Um potencial modelo biológico em experimentação animal. *Bol Inst Pesca*. 2016; 42: <http://dx.doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n4p766>
- [13] Siqueira-Silva DHD, Silva APS, Ninhaus-Silveira A, Veríssimo-Silveira R. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. *Theriogenology*. 2015, 84(6): 1033-1042. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.004>
- [15] Aires ED, Stefanini MA, Orsi AM. Características ultra-estruturais e diferenciativas das espermátides de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermiogênese. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.* 2000; 37(3): 183-188. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962000000300002>
- [16] Veríssimo-Silveira R, Gusmão-Pompiani P, Vicentini CA, Quagio-Grassiotto. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Saminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). *Acta Zool-Stockholm*. 2006; 87: 305-313. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2006.00243.x>

- [17] Mata RA, Leme Dos Santos HS. Alterações morfológicas nas células gonadotróficas da piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. *Ars Vet.* 2003; 19(1): 001-007.
- [18] Weibel ER, Gomez DM. A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol.* 1962; 17(2): 343-348. <https://doi.org/10.1152/jappl.1962.17.2.343>
- [19] Rodrigues MS, Siqueira-Silva DHD, Postingel-Quirino P, Ninhaus-Silveira A, Veríssimo-Silveira R. The efficiency of spermatogenesis and the support capacity of Sertoli cells in Characiformes. *Theriogenology.* 2017; 103: 149-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.025>
- [20] Leal MC, Cardoso ER, Nobrega RH, Batlouni SR, Bogerd J, França LR, et al. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biol Reprod.* 2009; 81: 77-187. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076299>
- [21] Costa FG, Adolphi MC, Gomes CC, Jesus LWO, Batlouni SR, Borella MI. Testes of *Astyanax altiparanae*: The Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis. *Micron.* 2014; 61: 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.02.004>
- [22] Nascimento NF, Siqueira-Silva DHD, Pereira-Santos M, Fujimoto T, Senhorini JA, Okada LS et al. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. *Zygote.* 2017; 25(4): 537-544. <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199417000399>
- [23] Abe KT, Mariguela TC, Avelino GS, Foresti F, Oliveira C. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. *BMC Evol Biol.* 2014; 14(152): 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-152>
- [24] Ashikaga FA, Orsi ML, Oliveira C, Senhorini JÁ, Foresti F. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. *Environ Biol Fish.* 2015; 98: 1845–1855. <https://doi.org/10.1007/s10641-015-0402-8>
- [25] Lopera-Barrero NM. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. *Cienc. Inv. Agr.* 2009; 36(2): 191-208. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202009000200004>
- [26] Nobrega RH, Batlouni SR, França LR. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem.* 2009; 35: 197–206. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-008-9252-z>

- [27] De Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 2000; 21(6): 776-798. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03408.x>
- [28] Bizzoto PM, Godinho HP. Morphometric evaluation of the spermatogenesis in trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Characiformes, Erythrinidae). *Rev Bras Zool*; 2007; 24(3): 541-544. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752007000300003>
- [29] Schulz RW, Nóbrega RH. Regulation of Spermatogenesis. In: Farrell AP. *Encyclopedia of Fish Physiology - From Genome to Environment*. Academic Press; 2011, p. 627 – 634.
- [30] Ewing HH, Spermatogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Anat Rec* 1972; 172:308
- [31] Ando N, Miura T, Nader MR, Miura C, Yamauchi K. A method for estimating the number of mitotic divisions in fish testes. *Fisheries Sci*, 2000; 66(2): 299-303. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00047.x>
- [32] Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR, Godinho HP. Sertoli cell proliferation in the adult testis - Evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod.* 2005; 73(5): 891-898. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.039891>
- [33] Hess RA, França LR. Structure of the Sertoli cell. In: Skinner MK, Griswold MD. *Sertoli Cell Biology*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005, p.19–40
- [34] Grier HJ, Linton JR, Leatherland JF, Vlaming VL. Structural Evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am J Anat.* 1980; 159: 331-345. <https://doi.org/10.1002/aja.1001590307>
- [35] Grier HJ Comparative Organization of Sertoli Cells Including the Sertoli Cell Barrier. In Russel LD, Griswold MD. *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache River Press; 1993, p. 704-730.
- [36] Petersen CW. Sexual selection and reproductive success in hermaphroditic seabasses. *Integr Comp Biol.* 2006; 46:439-448. <https://doi.org/10.1093/icb/icj045>
- [37] Ohta T, Miyake H, Miura C, Kamei H, Aida K, Miura T. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol Reprod.* 2007; 77(6): 970-977. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062299>
- [38] Grier HJ, Van den Hurk R, Billard R. Cytological identification of cell types in the testis of *Esox Lucius* and *E. niger*. *Cell Tissue Res.*1989; 257:491-496. <https://doi.org/10.1007/BF00221458>

- [39] Zirkin BR, Awoniyi C, Griswold MD, Russell LD, Sharpe R. Is FSH required for adult spermatogenesis?. *J. Androl.* 1994; 15(4): 273–276. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1994.tb00449.x>
- [40] Sprando RL, Russel, LD. A comparative study of Sertoli cell ectoplasmic specialization in selected non-mammalian vertebrates. *Tiss Cell.* 1987; 19(4): 479-493. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(87\)90042-5](https://doi.org/10.1016/0040-8166(87)90042-5)
- [41] Courot M, Hochereau-De-Reviers M, Ortavant R. Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR, Wandemark NL. *The testis*, Nova York: Academic Press; 1970, p.339-432.
- [42] Billard R. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. I. Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann. Biol. Bioch. Biophys.* 1969; 9: 251–271. <https://doi.org/10.1051/rnd:19690208>
- [43] Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB. *Biologia de Campbell*. 10th ed. Porto Alegre: Artmed; 201