



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
Campus de Ilha Solteira

BRUNA MAYRA BISPO DA SILVA BRAZILIANO

DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DO PEIXE *Astyanax lacustris*
(CHARACIDAE) SUBMETIDOS POR TEMPO PROLONGADO À
TEMPERATURA DE 32°C.

Ilha Solteira

2021

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
ANIMAL-CTA**

BRUNA MAYRA BISPO DA SILVA BRAZILIANO

**DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DO PEIXE *Astyanax lacustris*
(CHARACIDAE) SUBMETIDOS POR TEMPO PROLONGADO À
TEMPERATURA DE 32°C.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira-UNESP como parte
dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Profa Dra Rosicleire Veríssimo Silveira
Orientadora

**Ilha Solteira
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Braziliano, Bruna Mayra.
B827d Desenvolvimento testicular do peixe *Astyanax lacustris* (Characidae)
submetidos por tempo prolongado à temperatura de 32°C / Bruna Mayra
Braziliano. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2021
45 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Produção Animal, 2021

Orientador: Rosicleire Veríssimo Silveira
Inclui bibliografia

1. Reprodução. 2. Teleósteos. 3. Morfologia. 4. Estresse térmico.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB3 - 9999



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: O DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DE *Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE) SUBMETIDO A ESTRESSE TERMAL POR TEMPO PROLONGADO

AUTORA: BRUNA MAYRA BISPO DA SILVA BRAZILIANO

ORIENTADORA: ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA

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

Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. ALAN PERES FERRAZ DE MELO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. DIÓGENES HENRIQUE DE SIQUEIRA SILVA (Participação Virtual)
Faculdade de Biologia / Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - UNIFESSPA

Ilha Solteira, 27 de outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e por todas as oportunidades que me foram dadas;

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por todas as oportunidades;

Aos funcionários da Pós-Graduação em Ciências e tecnologia animal da UNESP-FEIS, por todo apoio;

Aos membros desta banca, obrigada por terem aceitado o convite e principalmente por contribuírem com o meu trabalho;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES);

A minha orientadora Profa. Dra. Rosicleire Veríssimo Silveira, por acreditar em mim quando nem mesmo eu acreditava, por cada ensinamento e cada palavra de apoio;

Aos meus companheiros de laboratório, por cada ajuda, cada aprendizado; um agradecimento especial a Patrícia Postingel Quirino, Yane Nascimento e Luciane Gomes, por sempre me ajudarem nas coletas;

Aos funcionários do Departamento de Biologia e Zootecnia – FEIS, Meiri, Júnior, Wilder e Sidival por terem paciência comigo;

Ao Prof. Dr. Alan Peres Ferraz de Melo pela oportunidade, ajuda e apoio;

Ao Médico veterinário Lucio de Oliveira e Sousa pelas oportunidades e apoio;

Aos meus pais, Edna Bispo da Silva Brasileiro e David Brasileiro, por absolutamente tudo, por todo o carinho e apoio comigo desde a graduação. Vocês são parte fundamental em todo este processo;

Ao meu namorado João Paulo, por todo apoio e ajuda;

Aos meus amigos que o mestrado me deu Gabriela Carvalho, Gaby Freitas, Yane Nascimento, Yasmin Forni, Amário e José, pelas disciplinas realizadas juntos, por terem paciência comigo e me ensinarem principalmente estatística.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Testículo tubular anastomosado, mostrando detalhes da distribuição das células germinativas no epitélio.....	13
Figura 02. Ilustração do processo Espermatogênese cístico em peixes. A -Representação do epitélio germinativo em peixes, evidenciando células somáticas e germinativas. B -descrição das células da linhagem espermatogênica.....	14
Figura 03- Estufa experimental e distribuição dos tanques do experimento.....	27
Figura 04- Ilustração da distribuição de tanques por tratamento.....	28
Figura 05- Ilustração do procedimento de anestesia e biometria.....	28
Figura 06- Biometria do exemplar de <i>Astyanax lacustris</i>	29
Figura 07- Testículo de <i>Astyanax lacustris</i> . A- Posição dos testículos na cavidade abdominal; B-testículos removidos.....	30
Figura 08- Testículo de <i>Astyanax lacustris</i> , fases apresentadas na Temperatura Ambiente.....	33
Figura 09- Testículo de <i>Astyanax lacustris</i> , fases apresentadas na Temperatura de 32°C.....	35
Figura 10- Frequência de espécimes de <i>Astyanax lacustris</i> por fases de maturação testicular para temperatura ambiente.....	38
Figura 11- Frequência de espécimes de <i>Astyanax lacustris</i> por fases de maturação testicular para temperatura de 32°C.....	38

Figura 12- Índice Gonadosomático (IGS) de *Astyanax lacustris* em temperatura ambiente (controle) e sob tratamento (32°C). As letras indicam diferença entre os meses para cada temperatura.....39

TABELAS

Tabela 01- Descrição das fases observadas no epitélio germinativo de *Astyanax lacustris* durante o período experimental em animais sob temperatura ambiente.....31

Tabela 02- Descrição das fases observadas no epitélio germinativo de *Astyanax lacustris* durante o período experimental 32°C.....32

RESUMO

Frente as condições extremas presentes no mundo, são agravadas pelas mudanças climáticas. Atribuída a emissão de gases pela atividade humana, resultando no aquecimento global. A influência da temperatura na reprodução dos peixes é de suma importância, pois os peixes são animais ectodérmicos e dependem do meio que vivem para reprodução, desova e alimentação. Deste modo foi escolhida a espécie de peixe *Astyanax lacustris*, este trabalho teve por objetivo avaliar o papel da alta temperatura no desenvolvimento testicular dessa espécie, quando os indivíduos foram expostos por seis meses a uma temperatura de 32°C, além de avaliar e caracterizar as fases do ciclo reprodutivo com base nas alterações do epitélio germinativo nas temperaturas testadas e avaliar o índice gonadosomático (IGS). Para tal, cento e trinta espécimes machos de *A. lacustris* foram mantidos em sistemas de circulação fechado sob temperatura da água ambiente (27,5°C) e 32°C. A realização das coletas ocorreu todo mês por um período de seis meses. Os testículos foram removidos, fixados, processados, incluídos em historesina e seccionados a 3 µm, submetidos a colorações de Hematoxilina/Eosina. Os resultados obtidos a partir da temperatura ambiente permitiram classificar as fases da espermatogênese de *A. lacustris* em fase Apto Espermição-subfase Intermediário, subfase Apto final, subfase Apto Final/ Regressão e fase Regressão, subfase- Regressão/ Proliferação espermatogonial, os obtidos a partir da temperatura de 32°C foi fase espermição, subfase- Apto intermediário, subfase- Apto Intermediário/Vacúolos, subfase- Apto final, subfase- Apto Final/Vacúolos, subfase Apto Intermediário/ Regressão, subfase-Apto Final/ Regressão e fase Regressão. Os resultados mostram que a alta temperatura desregulou a espermatogênese em *A. lacustris*, levando à produção de menos cistos e causando danos no epitélio e em algumas células germinativas, tais como a presença de vacúolos.

Palavras-chave: morfologia; teleósteos; estresse térmico

ABSTRACT

In view of the established climate change scenario and consequently the changes in global temperature, the influence of temperature on fish reproduction and the ecological and economic importance of the group as a whole. This study aimed to evaluate the role of high temperature in the testicular development of *Astyanax lacustris*, exposed for a long time, as well as to evaluate and characterize the phases of the reproductive cycle based on changes in the germinal epithelium at the temperatures tested, correlating with the gonadosomatic index (IGS). For this purpose, one hundred and thirty male specimens of *A. lacustris* were kept in a closed circulation system (800L) at room temperature and exposed to thermal stress at 32°C with an experimental period of six months (Oct/19 to Apr/20). During the entire experimental period, monthly collections were performed, in which the length of the specimens was measured, both body and gonad masses were measured, sectioned and fixed and later processed for histological analysis with a pre-established protocol, after processing of inclusion, the material was sectioned at 3µm, submitted to Hematoxylin/Eosin staining. The results obtained from room temperature allowed the classification of the phases in the reproductive cycle of male of *A. lacustris* in: phase spawning capable: mid subphase and late subphase; late subphase/regression; regression; regression/spermatogonial proliferation subphase. The phases obtained from the 32°C temperature were spawning capable phase, mid subphase; mid subphase /vacuoles; late subphase; late subphase/vacuoles; mid subphase /regression; late subphase/regression and regression phase. The present results show that the high temperature deregulated spermatogenesis in *A. lacustris*, leading to the production of fewer cysts and causing damage to the epithelium and some germ cells, such as the presence of vacuoles.

Keywords: morphology; teleosts; thermal stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
	REFERÊNCIAS	19
	CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DO PEIXE <i>Astyanax lacustris</i> (CHARACIDAE) SUBMETIDOS POR TEMPO PROLONGADO À TEMPERATURA DE 32°C	24
1	INTRODUÇÃO	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1	COMITÊ DE ÉTICA	25
2.2	Animais	25
2.3	Delineamento experimental	25
2.4	Biometria	27
2.5	Processamento e análises	28
3	RESULTADOS	29
4	DISCUSSÃO	39
	REFERÊNCIAS	45
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43

1. INTRODUÇÃO

Mudanças climáticas e peixes

Os efeitos das mudanças climáticas de modo geral, afetam e modificam a composição e o funcionamento de praticamente todos os ecossistemas da Terra (AYLLÓN *et al.*, 2020). Além do aquecimento, a mudança no uso da terra e perda de habitat são as três principais ameaças à biodiversidade aquática em todo o mundo sob a influência de distúrbios antrópicos (BAO *et al.*, 2021).

O aumento da temperatura do ar e a mudança dos padrões de precipitação por exemplo, alteram a temperatura da água e os regimes do fluxo em todo o mundo (KNOUFT, FICKLIN 2017). No caso dos peixes dulcícolas, em particular os neotropicais, a exposição a essas mudanças os coloca em posição de maior vulnerabilidade do que os peixes marinhos, porque os sistemas de água doce são mais rasos e têm uma capacidade de amortecimento térmico menor (FAO, 2018).

Estima-se que um aumento na temperatura da água nos rios e mares de 1,4–5,8°C ocorra até o final deste século, em decorrência das mudanças climáticas e ao aquecimento do planeta (IPCC, 2021). O painel Intragovernamental sobre mudanças climáticas (IPCC), publicou um relatório mostrando que as mudanças climáticas causadas pelos seres humanos são irrefutáveis, gerando um serie de consequências, como a mudança na composição da fauna e da flora pelo mundo, aumento de desastres naturais como tempestades, inundações, furacão e perda de recursos costeiros (IPCC, 2021). Aumento da temperatura da terra em estudos recentes vêm sugerindo a extinção de quase metade das espécies de água doce nas próximas décadas, com um declínio pronunciado nos trópicos (MANJARRÉS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021).

Em cenários pouco otimistas, com um aumento de 3,2°C e 2 °C respectivamente, cerca de 36% e 9% das espécies de água doce estariam expostas a extremos climáticos. Já em cenário mais otimista, a limitação a 1,5°C reduziria para 4% as espécies expostas a extremos de temperatura, sendo as espécies de água doce da região tropical as mais afetadas (BARBAROSSA *et al.*, 2021). Com um agravante para espécies com tamanho corporal menor e/ou áreas geográficas limitadas tendem a uma maior probabilidade de extinção (MANJARRÉS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Isso porque, as espécies tropicais vivem em um ambiente térmico uniforme e estão próximas de seus limites térmicos, sendo assim extremamente vulneráveis ao aquecimento global. Como exemplo, espécies amazônicas podem apresentar pouca plasticidade de se adequar às mudanças climáticas, uma vez que não há varrições bruscas em seus habitats (MADEIRA *et al.*, 2016, CAMPOS *et al.*, 2017).

No entanto, as respostas fisiológicas à temperatura elevada da água observadas em ambiente controlado, como laboratórios, não podem ser usadas como medidas responsáveis por toda a extensão da complexidade ecológica, uma vez que podem não coincidir com as respostas observadas na natureza, porém é uma fonte segura para propor medidas mitigadoras (POTTS *et al.*, 2021).

Dentre as respostas fisiológicas, considerando os componentes do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, as variações na temperatura afetam principalmente as gônadas, as quais são mais facilmente danificadas por tratamentos térmicos através da inibição da expressão e síntese adicional de proteínas relacionados com a esteroidogênese gonadal (MIRANDA *et al.*, 2013).

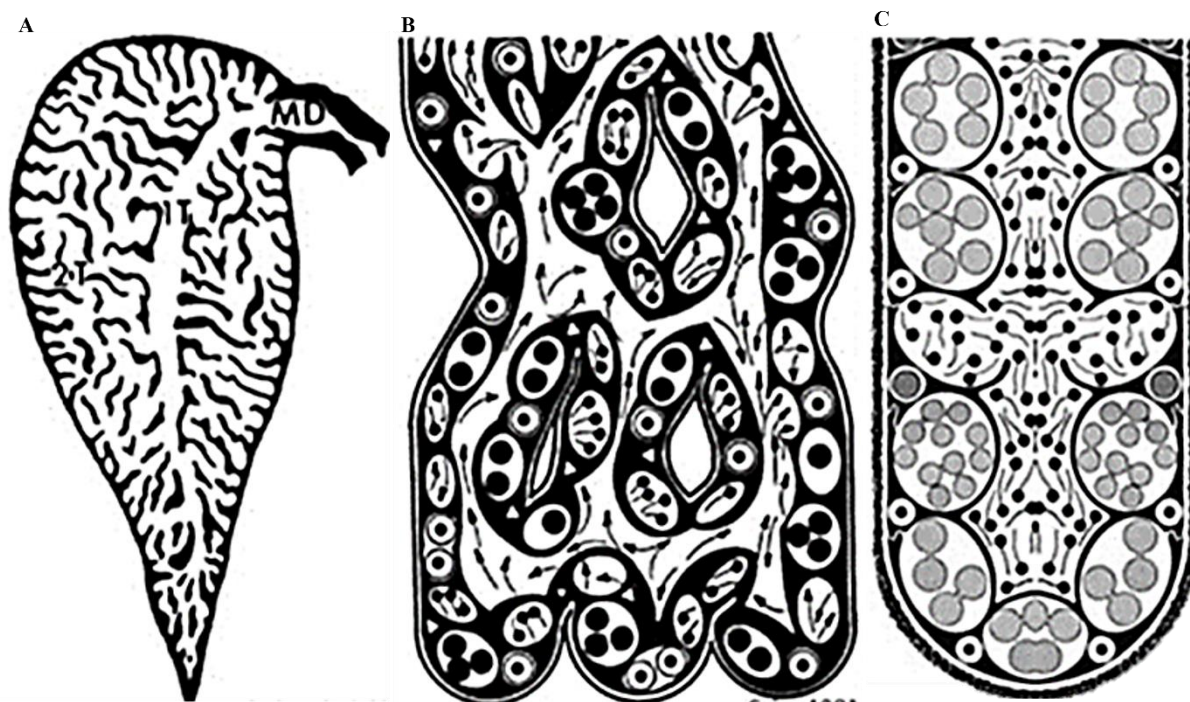
Organização Testicular em Peixes

Na maioria dos teleósteos, os testículos são órgãos pares (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2020), com simetria semelhante entre o direito e esquerdo, alongados, emparelhados, ligados à parede dorsal do corpo pelo mesórquio, unindo-se na extremidade caudal, formando um ducto espermático que se exterioriza através da papila urogenital, por onde o sêmen é liberado, podendo sofrer modificações morfoestruturais ao longo do ciclo (RODRIGUES; QUEROL; BRACCINI, 2005; GRIER; URIBE-ARANZÁBAL, 2009; COSTA *et al.*, 2014; CHAGAS *et al.*, 2014; QUIRINO, 2021).

Uma camada de tecido conjuntivo reveste todo o órgão, com projeções sendo emitidas para o seu interior, delimitando assim os lóbulos ou túbulos seminíferos que revestem e sustentam o tecido epitelial germinativo (EG), denominados de interstício, sendo estas regiões separadas estruturalmente pela membrana basal (GRIER, 1981). Essas projeções de tecido conjuntivo, delimita o testículo em dois compartimentos, o epitélio germinativo, que desempenhará as funções espermatogênicas e a região intersticial, responsável pela síntese esteroidogênica, (LACERDA, 2006). Tornando-o assim parcialmente endócrino, uma vez que tem capacidade de liberação de esteroides (TOVO-NETO *et al.*, 2020).

De acordo com a espécie, a organização do epitélio germinativo pode apresentar características pontuais e singulares, permitindo classificá-lo em dois tipos: tubular anastomosado, presentes nas espécies filogeneticamente mais basais, tais como o *Astyanax lacustris* (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2017), caracterizado pela formação de anastomoses ou seções em seu epitélio germinativo, em que os compartimentos encontram-se interconectados, impedindo a identificação do início ou término do túbulo (PARENTI; GRIER, 2004) (Fig. 01).

Figura 01- A-Testículo tubular anastomosado, B e C-detalhes da distribuição das células germinativas no epitélio, de acordo com o tipo espermatogonial (B-irrestrito/C-restrito).



(adaptado de Grier *et al.*, 1980)

Já no testículo com características lobulares, o compartimento germinativo é definido por apresentar formato digitiforme, que se estende em prolongamentos que terminam em um fundo cego na periferia do testículo. Podendo ainda, de acordo com a distribuição das espermatogônias ao longo dos lóbulos apresentar duas características que os particularizam lobular irrestrito e lobular restrito (GRIER, 1993; PARENTI E GRIER, 2004; GRIER ; URIBE, 2009). Sendo este tipo de estrutura testicular observada em espécies mais derivadas, tais como os Neoteleósteos, caso do tucunaré *Cichla kelberi* (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2013).

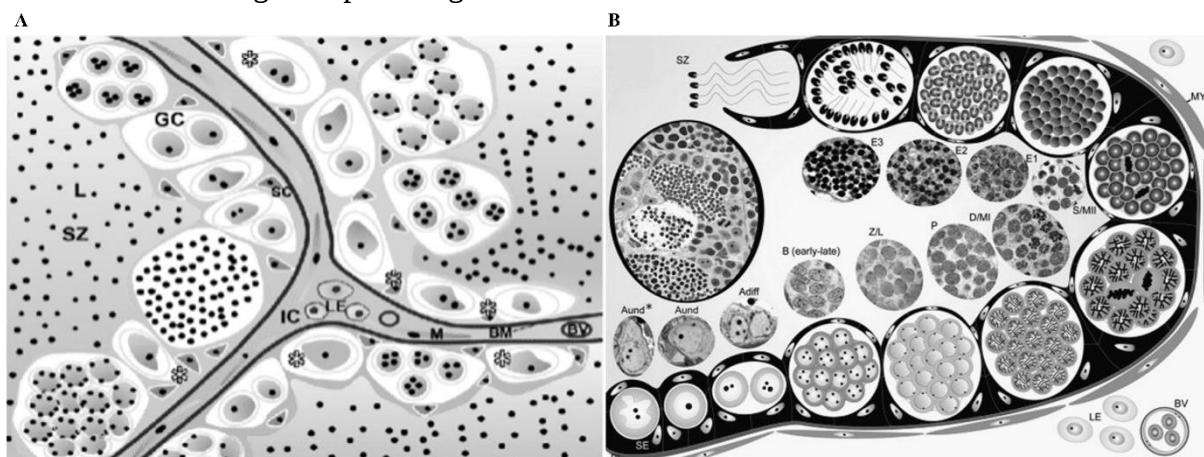
Mesmos com essas características que definem o tipo testicular na maioria dos peixes ósseos, tanto em espécies com testículos lobulares (restrito/irrestrito), como tubulares anastomosados, os compartimentos germinativos e intersticiais permanecem separados pela membrana basal, que é responsável por fornecer suporte tanto as células de Sertoli, como as células da linhagem germinativa (GRIER *et al.*, 1992)

Espermatogênese

A espermatogênese é um processo conservativo para a maioria dos vertebrados, diferindo em alguns aspectos em peixes e anfíbios (GRIER, 1993).

A produção de espermatozoides haploides funcionais é um importante pré-requisito para a reprodução em machos (THÖNNES *et al.*, 2020). Sendo uma atividade equilibrada das células-tronco espermatogoniais, que se autorrenovam para produzir mais células-tronco, assim como mantê-las no epitélio (DE ROOIJ; RUSSELL, 2000; SCHULZ, MIURA, 2002; EHMCKE *et al.*, 2006). Todo esse processo ocorre simultaneamente a proliferação celular, diferenciação e crescimento do tecido (NAKAMURA *et al.*, 1998). A espermatogônia uma vez envolvida pelas projeções das células de Sertoli, forma o espermatocisto, no epitélio germinativo que reveste o compartimento seminífero testicular (GRIER, 1981; 2002; BILLARD, 1986; PUDNEY, 1995; GURAYA, 2001; GRIER; URIBE, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). (Fig. 03).

Figura 02- Ilustração do processo Espermatogênese cística em peixes. A-Representação do epitélio germinativo em peixes, evidenciando células somáticas e germinativas. B-descrição das células da linhagem espermatogênica.



Adaptado: Siqueira-Silva *et al.*, 2018^a; Schulz e Nóbrega, 2010^b

Com o início da meiose, as espermatogônias encistadas, diferenciam-se em espermatocistos primários e com o início das divisões meióticas, consequentemente surgem os espermatocistos secundários. Ao final deste, originam-se as espermátides, e ainda no interior do cisto a espermatogênese se completa com a formação da célula haploide (GRIER, 1981; GRIER, 1993; GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001; SCHULZ, *et al.*, 2010).

O encistamento das espermatogônias pelas células de Sertoli é fundamental para a sincronia do mesmo, no caso de teleósteos, e estas células formam uma barreira hemato-testicular favorável que se unem umas às outras através de especializações presentes nas suas membranas (LOIR *et al.*, 1995).

Com a formação dos espermatozoides, as células que antes a englobavam, se rompem e os liberam para o lúmen do epitélio germinativo. Em relação a esse processo, Grier (1993) o denominou como contínuo ou descontínuo sendo corroborado por Taylor (1998). De acordo com os autores e demais pesquisadores, o epitélio contínuo caracteriza-se 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; TAYLOR, 1998; GRIER; LO NOSTRO, 2000; BROWN-PETERSON *et al.*, 2002; GRIER; ARANZABAL, 2009).

Posteriormente padronizado por Brown-Peterson e colaboradores (2011), criando assim, uma classificação para auxiliar na melhor compreensão da maturação testicular. A classificação testicular foi dividida nas seguintes fases e subfases.

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). A classificação testicular foi dividida nas seguintes fases:

Imaturo: testículos pequenos, translúcidos e filiformes, possui somente espermatogônias indiferenciadas e nunca liberou espermatozoides.

Em desenvolvimento: se inicia quando os testículos começam a crescer e se desenvolver. Os testículos são pequenos, com facilidade para serem identificados. Início da espermatogênese e formação dos espermatócitos. Presença de espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes iniciais e finais. Não contém espermatozoides no lúmen. O epitélio germinativo é contínuo por todo o testículo.

Apresenta uma subfase Inicial: quando apenas espermatogônias e espermatócitos primários presentes.

Apto a reprodução: testículos grandes, firmes e opacos. Espermatozoides presentes no lúmen dos túbulos seminíferos. Ocorrem todos os estágios da espermatogênese e o epitélio é descontínuo.

Subfases:

Inicial: epitélio contínuo ao longo de todo o testículo;

Intermediária: epitélio germinativo descontínuo nas proximidades do ducto espermático;

Final: epitélio germinativo descontínuo por todo o testículo.

Regressão: testículos pequenos e flácidos, espermatozoides não liberados sob pressão. Presença de espermatozoides residuais no lúmen. Contendo espermátides não liberadas. Proliferação das espermatogônias e regeneração do epitélio germinativo tendo início.

Regeneração: testículos pequenos e filiformes. Lúmen dos túbulos seminíferos não detectável ou discreto. Espermatogônias em proliferação por todo testículo. Ausência de espermatocistos. Espermatozoides residuais podem estar presentes no lúmen dos túbulos seminíferos e ducto espermático (BROWN-PETERSON *et al.*, 2011).

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).

Deste modo, considerando que os peixes são bons modelos para pesquisas relacionadas à influência de fatores ambientais sobre a sua reprodução, um evento fisiológico de custo energético muito alto e ocorre somente quando os animais estão em condições favoráveis (RIBEIRO; GUIMARÃES, 2012).

A espécie modelo: Lambari do rabo amarelo *Astyanax lacustris*

São pertencentes à ordem Characiformes, família Characidae e gênero *Astyanax* (SANTOS, 2004). O lambari do rabo amarelo é uma espécie de pequeno porte, tendo de 10 a 15 cm de comprimento e pesa em média 60 gramas. Tem um hábito onívoro e cresce rapidamente, alcançando a maturidade sexual por volta dos quatro meses de idade em condições de cultivo. São encontrados ao longo de pequenos riachos, lagos e rios que formam bacias hidrológicas em ambientes tropicais (PORTO-FORESTI *et al.*, 2001).

Para esta espécie, durante o período reprodutivo existem diferenças morfológicas óbvias entre machos e fêmeas. Além de serem maiores e mais abauladas na região ventral, as fêmeas geralmente amadurecem mais cedo, enquanto a taxa de crescimento dos machos é superior à das fêmeas (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2006). Durante este período, as fêmeas ainda são fortemente irrigadas por vasos sanguíneos, principalmente na região ventral do corpo, nas barbatanas peitorais e pélvicas. Os machos são pequenos e esguios. Durante o período reprodutivo os machos de *Astyanax lacustris* possuem nadadeira anal mais áspera, devido a presença de espículas, sendo uma característica fundamental para selecionar os machos (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005).

Sabe-se que a produção atual desta espécie é utilizada principalmente para comercialização de iscas vivas e consumo direto (FERREIRA *et al.*, 2014). Além disso, tem

sido utilizado como modelo biológico (CARNEIR-LEITE *et al* 2022; QUIRINO *et al* 2021) devido às suas características de rápido crescimento, fácil manuseio, aceitação de alimentação artificial e alta fecundidade (DRUMMOND *et al.*, 2000).

Diante do exposto acima com relação ao aquecimento global, a influência da temperatura na reprodução dos peixes e da importância ecológica e econômica do *A. lacustris*, este trabalho teve por objetivo avaliar o papel da alta temperatura no desenvolvimento testicular dessa espécie, quando os indivíduos são expostos por um tempo prolongado de 6 meses a uma temperatura de 32°C.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Considerando o aquecimento global, a influência da temperatura na reprodução dos peixes e da importância ecológica e econômica do *A. lacustris*, este trabalho teve por objetivo avaliar o papel da alta temperatura no desenvolvimento testicular dessa espécie, quando os indivíduos são expostos por um tempo prolongado de seis meses a uma temperatura de 32°C.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os aspectos morfológicos dos testículos;
- ✓ Caracterizar as fases do ciclo reprodutivo com base nas alterações do epitélio germinativo nas temperaturas testadas (temperatura ambiente e a 32°C);
- ✓ Realizar uma análise comparativa do desenvolvimento testicular e Índice Gonadosomático (IGS)

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. B. C. *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- AYLLÓN, D.; NICOLA, G. G.; ELVIRA B; ALMODÓVAR, A. Climate change will render size-selective harvest of cold-water fish species unsustainable in Mediterranean freshwaters. **Journal of Applied Ecology**, Chichester, v. 58, n. 3, p. 562–575, 2020.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2002. v. 377.
- BAO, H.; WANG, G.; YAO, Y.; PENG, Z.; DOU, H.; JIANG, G. Mudanças causadas pelo aquecimento no controle ecológico das comunidades de peixes em um grande lago no norte da China ao longo de 66 anos. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 770, p. 144722, 2021.
- BARBAROSSA, V.; BOSMANS, J.; WANDERS, N.; KING, H.; BIERKENS, M. F. P.; HUIJBREGTS, M. J.; SCHIPPER, A. M. Threats of global warming to the world's freshwater fishes. **Nature Communications**, London, v. 12, n. 1, 2021.
- BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium: An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 116-132, 2006.
- BRIERLEY, A. S.; KINGSFORD, M. J. Impacts of climate change on marine organisms and ecosystems. **Current Biology**, Cambridge, v.19, n. 14, p. 602-614, 2009.
- 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**, Chichester, v. 60, p. 178-202, 2002.
- BROWN-PETERSON, N. J. *et al.* A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management and Ecosystem Science**, Chichester, v. 3, p. 52-70, 2011.
- BRYNDUM-BUCHHOLZ, A.; TITTENSOR, D. P.; BLANCHARD, J. L.; CHEUNG, W. W. L.; COLL, M.; GALBRAITH, E. D.; JENNINGS, S.; MAURY, O.; LOTZE, H. K. Os impactos das mudanças climáticas do século XXI na biomassa de animais marinhos e na estrutura do ecossistema nas bacias oceânicas. **Global Change Biology**, Chichester, v. 225, p. 459 – 472, 2019.
- BUZOLLO, H.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. ;OLIVEIRA-ALMEIDA, I. R.; ALEXANDRE, J. S.; OKUDA, H. T.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Structural analysis of the *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) embryogenesis (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 9, p. 601-616, 2011.

CALDEIRA, K.; WICKETT, M. E. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. **Journal of Geophysical Research**, Hoboken, v. 110, 12 p., 2005.

CAMPOS, D. F. *et al.* Metabolic rate and thermal tolerance in two congeneric Amazon fishes: *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 and *Paracheirodon simulans* Géry, 1963 (Characidae). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 789, n. 1, p. 133-142, 2017.

CASTILHO-ALMEIDA, R. B. ***Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação.** 2017. 119 f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.
CLIMATE CHANGE 2018: **IPCC** second assessment; a report of the intergovernmental panel on climate change. 1995. 11 p. Disponível em: [http://www.ipcc.ch/pub/as\(E\).pdf](http://www.ipcc.ch/pub/as(E).pdf). Acesso em: 16 jun. 2021

COSSINS, A. R.; CRAWFORD, D. L. Fish as models for environmental genomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, n. 4, p. 324-333, 2005.

COSTA, F. G. **Testículo de *Astyanax altiparanae*: Estudo Morfológico, Ultraestrutural e Imuno-histoquímico.** 2011. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DEVLIN, R.; NAGAHAMA, Y. **Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences.** Aquaculture Amsterdam, v. 208, p. 191-364, 2002.

DONELSON, J. M.; MUNDAY, P. L.; MCCORMICK, M. I.; PANKHURST, M. W.; PANKHURST, P. M. Effects of elevated water temperature and food availability on the reproductive performance of a coral reef fish. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, v. 401, p. 233-243, 2010.

DRUMMOND, C. D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, A. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 287, n. 2, p. 176-182, 2000.

DZIEWULSKA, K.; DOMAGALA, J. Histology of salmonid testes during maturation. **Reproductive Biology**, Warsaw, v. 3, n. 1, p. 47-61, 2003.

FERRAZ, F. M.; CERQUEIRA, V. R. Influência da temperatura na maturação gonadal de machos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 32, p. 73-83, 2010.

FERREIRA, P. M. F.; NASCIMENTO, L. S.; DIAS, D. C.; MOREIRA, D. M. V.; SALARO, A. L.; FREITAS, M. B. D. Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Hoboken, v. 45, n. 1, p. 28-34, 2014.

FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B. Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, p. 1-5, 2001.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. São Paulo: Ed. da Unesp, 2003. 332 p.
GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. (ed.). **The sertoli cell cache river press**. New York: [s.n.], 1993. p. 704-739.

GRIER, H. J.; LINTON, J. R.; LEATHERLAND, J. F.; DE VLAMING, V. L. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. **American Journal Anatomy**, Hoboken, v. 159, p. 331-45, 1980.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**, Oxford, v. 21, p. 345-357, 1980.

GRIER, H.J. Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. **Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 261, p. 151-60, 1992.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, Chichester, v. 53, p. 521-42, 1998.

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. **Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, Charleston, v. 53, 537-580, 2002.

KAVAMOTO, E. T. Mudanças morfológicas dos testículos de curimatã *Prochilodus scrofa* (Steindachner) (teleostei, prochilodontidae), submetido à indução hormonal. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 109-115, 1998.

LE FRANÇOIS, N. R.; BLIER, P. U. Reproductive events and associated reduction in the seawater adaptability of brook charr (*Salvelinus fontinalis*): evaluation of gill metabolic adjustments. **Aquatic Living Resources**, Cedex, v. 16, n. 2, p. 69-76, 2003.

LEIRA, M. H.; CUNHA, L. T.; BRAZ, M. S.; MELO, C. C. V.; BOTELHO, H. A.; REFHIM, L. S. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **PUBVET**, Maringá, v. 11, p. 11-17, 2017.

LE QUÉRE. Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. **Nature Geoscience**, London, v. 2, n. 12, p. 831-836, 2009.

MADEIRA, D.; ARAÚJO, J. E.; VITORINO, R.; CAPELO, J. L.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Ocean warming alters cellular metabolism and induces mortality in fish early life stages: a proteomic approach. **Environmental Research**, Maryland Heights, v. 148, p. 164-176, 2016.

MOURAD, N. M. N. **Crescimento ponderal e morfométrico do pacu *Piaractus mesopotamicus*, tambaqui *Colossoma macropomum* e seus híbridos da primavera ao inverno**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestre em Zootecnia) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

NINHAUS-SILVEIRA, A. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 651-659, 2006.

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

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

PÖRTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Philadelphia, v. 132, n. 4, p. 739-761, 2002.

PORTO-FORESTI, F. Cultivo do lambari: uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, v. 11, n. 67, p. 15-19, 2001.

PORTO-FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura em Santa Maria**. Santa Maria: Ed UFMS, 2005. 468 p.

POUGH, F. H.; JANES, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; PESSANO, E. F. Influência de fatores abióticos sobre a dinâmica da reprodução do cascudo viola *Loricariichthys platymetopon* (Isbrucker & Nijssen, 1979) (Osteichthyes, Loricariidae), no reservatório da estância Nova Esperança, Uruguaiana, bacia do Rio Uruguai, RS, Brasil. **Biodiversidade Pampeana**, Uruguaiana, v. 2, p. 24-29, 2004.

QUIRINO, P. P. The influence of increased water temperature on the duration of spermatogenesis in a neotropical fish, *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Fish Physiol Biochem**, Holanda, v. 49, n. 4, p. 1-9, 2020.

REBOUÇAS, P. M. L.; LIMA, L. R.; DIAS, Í. F.; BARBOSA FILHO, J. A. D. Influence of thermal oscillation in pisciculture water. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, Mossoro, v. 2, n. 2, p. 35-42, 2014.

RIBEIRO, C. S.; MOREIRA, R. G. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 58-61, 2012.

SANTOS, A. J. G. **Fisiologia dos animais aquáticos**: de uma maneira concisa e precisa. Recife: Ed. da UFRPE, 2004. p. 33-34.

SANTOS, T. M. L. **Influência da temperatura sobre o desenvolvimento de juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2018. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 267-273, 2006.

SCHULTE, P. M. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 218, n. 12, p. 1856-1866, 2015.

SCHULZ, R. W. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v. 165, n. 3, p. 390-411, 2010.

SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H. Anatomy and histology of fish testis. In: FARRELL, A. P. (ed.). **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**. San Diego: Academic Press, 2011. V. 1, p. 616–626.

SILVA, D. F.; SOUSA, F. A. S.; KAYANO, M. T. Avaliação dos impactos da poluição nos recursos hídricos da bacia do rio Mundaú (AL e PE). **Revista de Geografia**, Recife, v. 24, n. 3, p. 210-223, 2007.

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

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; RODRIGUES, M. D. S.; NÓBREGA, R. H. Testis structure, spermatogonial niche and Sertoli cell efficiency in neotropical fish. **General and Comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v. 273, p. 218– 226, 2018.

STILLMAN, J. H. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. **Science**, Washington, v. 301, n. 5629, p. 65-65, 2003.

TEWKSBNRY, J. J.; HUEY, R. B.; DEUTSCH, C. A. **Putting the heat on tropical animals**. **Science**, Washington, v. 320, n. 5881, p. 1296, 2008.

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

WOOD, C. M.; MCDONALD, D. G. **Global warming: implications for fresh water and marine fish**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 425 p.

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DO PEIXE *Astyanax lacustris* (CHARACIDAE) SUBMETIDOS POR TEMPO PROLONGADO À TEMPERATURA DE 32°C

1. INTRODUÇÃO

Nos peixes, a espermatogênese ocorre em unidades funcionais denominadas por espermatocistos, que são constituídos por grupos de células germinativas em um mesmo estágio de desenvolvimento, circundados por projeções citoplasmática das células de Sertoli (SCHULZ *et al.*, 2010). A espermatogênese é influenciada por fatores abióticos, como, pH, oxigênio e temperatura, levando a estimulação da reprodução ou até mesmo à impedindo (RIBEIRO; MOREIRA, 2012). Deste modo, o aumento da temperatura global e as mudanças climáticas têm sido muito discutidos, pois são fatores preocupantes que comprometem a reprodução dos peixes e a sobrevivência de espécies. (WALTER, 2007).

Nesse sentido, estudos vão demonstrando os efeitos da alta temperatura da água na reprodução dos teleósteos, a exemplo do trabalho realizado com casais de *Gobiocypris rarus*, com temperatura da água dos tratamentos de 18°C, 21°C, 24°C, 27°C e 30°C, comprovou que a alta temperatura (30°C) influenciou diminuindo a frequência da desova e da taxa de fertilização, e aumentou a taxa de malformação das larvas, como olhos pequenos, saco vitelino irregular e cauda curta (LUO *et al.*, 2017).

Outro estudo realizado com machos de tilápia-do-Nilo, em temperaturas de 36°C, 37°C e 27°C (controle), foi observado que os animais expostos as temperaturas de 36°C e 37°C mostraram uma perda de células germinativas testiculares em comparação ao controle (JIN *et al.*, 2019), foi observado também que a temperatura de 36°C interferiu na redução da densidade espermática, sendo mais severa nos animais que estavam em 37°C.

No caracídeo neotropical *Astyanax lacustris*, a temperatura da água influenciou diretamente na duração da espermatogênese (fase meiótica à fase espermiogênica), os animais mantidos a uma temperatura da água de 27°C tiveram uma duração da espermatogênese estimada em 6 dias, enquanto aqueles em 32°C o processo durou aproximadamente um dia (QUIRINO *et al.*, 2019). Para a mesma espécie, foi demonstrado que animais mantidos a uma temperatura de 35°C tiveram a espermatogênese deplecionada após 3 semanas de exposição, e após a quinta semana, o epitélio apresentava visível redução de todos os cistos (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2015).

No relatório do IPCC (*The Intergovernmental Panel on Climate Change*), foi discutido que as atividades humanas tenham causado aproximadamente 1°C de aquecimento global acima dos níveis pré-industriais. Essa mudança climática está sendo causada principalmente pela liberação de gases que retêm o calor, como o dióxido de carbono, que são produzidos em excesso por veículos, processos industriais e usinas de energia (IPCC, 2018).

Tendo em vista a conhecida influência da temperatura da água sobre os peixes, este trabalho teve como objetivo analisar a influência da temperatura elevada no desenvolvimento testicular dos machos de *Astyanax lacustris* a longo prazo, bem como os aspectos morfológicos dos testículos, descrever as fases do ciclo reprodutivo com base nas alterações do epitélio germinativo nas temperaturas testadas e avaliar o índice gonadossomático.

O *Astyanax lacustris* é usado como isca viva para pesca esportiva e consumo humano, sua maturação sexual é alcançada com aproximadamente quatro meses, apresenta reprodução contínua ao longo do ano e sua temperatura conforto está na faixa de 26°C a 28°C (GARUTTI., 2003; PORTO-FORESTI *et al.*, 2005). Devido ao seu pequeno tamanho, resistência a condições ambientais e facilidade de reprodução, a espécie também se tornou um modelo experimental neotropical interessante em estudos aplicados (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2018).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COMITÊ DE 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 CEUA- FEIS/UNESP 10/2020.

2.2. ANIMAIS

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 130 exemplares machos, com idade de 4 meses de *Astyanax lacustris*, obtidos do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Jaboticabal/SP. A separação de machos e fêmeas ocorreu no local, de modo que a identificação do sexo foi feita utilizando a presença das espículas na nadadeira anal dos machos (MALABARBA; WEITZMAN, 2003).

2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O desenvolvimento da pesquisa ocorreu em tanques de 1000 L em sistema de recirculação de água, nas dependências da estufa do Laboratório de Ictiologia Neotropical – LINEO, UNESP - Ilha Solteira, no período de agosto de 2019 a maio de 2020 (Fig. 1). Os

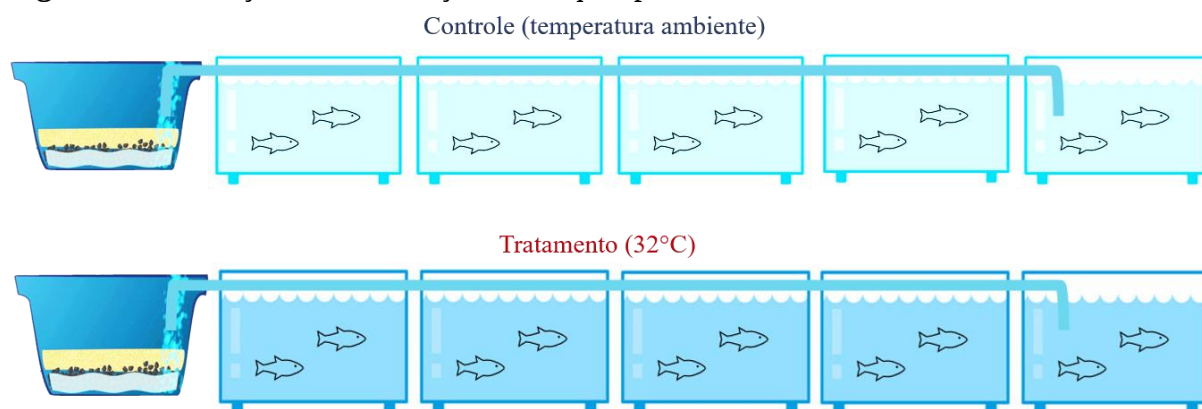
espécimes de *A. lacustris* foram divididos em dois tratamentos (n=65), temperatura ambiente (TA) e temperatura constante a 32°C, com cinco repetições, totalizando assim, 10 unidades experimentais em um delineamento inteiramente casualizado (Fig. 04).

Figura 03- Estufa experimental e distribuição dos tanques do experimento



Fonte: Própria autora.

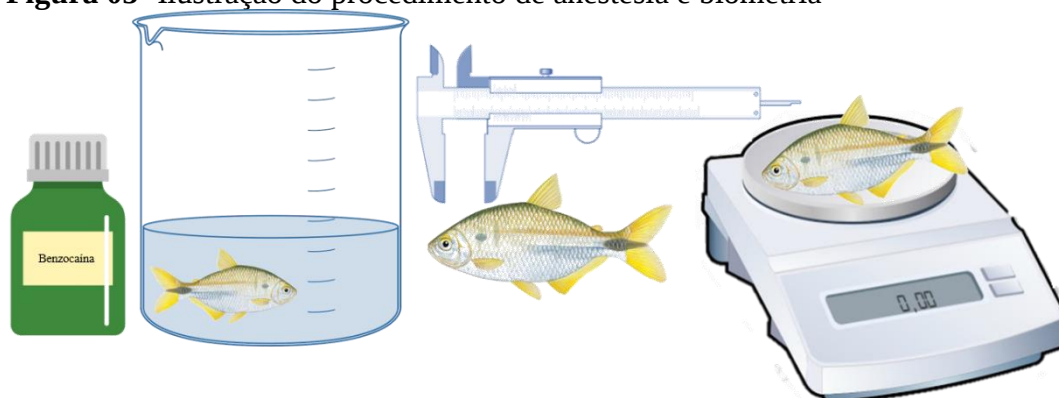
Inicialmente os dois grupos foram mantidos em temperatura ambiente (média de 27°C) por um período de sete dias para o ajuste do sistema de recirculação. Após esse período, um grupo permaneceu com água do sistema em temperatura ambiente-controle (TA) e, o outro grupo foi exposto a uma temperatura constante de 32°C (T32), a temperatura escolhida se refere às previsões de aumento de temperatura global estimada pelo IPCC 2014 (Fig. 05). A variação da temperatura no grupo TA foi aferida de hora em hora, com o uso do “data logger” e, para a manutenção e controle do T32 foi utilizado um aquecedor ligado a um termostato.

Figura 04- Ilustração da distribuição de tanques por tratamento

Fonte: Própria autora.

2.4.BIOMETRIA

Após o período de aclimação foram coletados 5 exemplares, por tratamento, para a biometria inicial e caracterização morfológica testicular. A partir desse momento, foram realizadas sete coletas mensais utilizando 10 exemplares por tratamento (dois por tanque). Os exemplares foram anestesiados em uma solução contendo 0,5 g de cloridrato de benzocaína, dissolvida em 5 mL de etanol absoluto e 2 L de água. Após anestesiados, a massa foi aferida, com o auxílio de uma balança analítica (Marte® - modelo AY220), e foram mensurados os comprimentos total e padrão, com o auxílio de um paquímetro (Fig. 06 e 07).

Figura 05- Ilustração do procedimento de anestesia e biometria

Fonte: própria autora

Figura 06- Biometria do espécime de *Astyanax lacustris*.



Fonte: Própria autora.

2.5.PROCESSAMENTO E ANÁLISES

Após realizada a biometria, os testículos de *A. lacustris* foram removidos e tiveram sua massa aferida, após isso, foram fragmentados e fixados em solução de 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato Sorensen 0,1 M a pH 7,2, por no mínimo 24 horas. Em seguida os fragmentos da região medial dos testículos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em glicol metacrilato historesina (LEICA ®), seccionados a 3.0 µm de espessura utilizando micrótomo (LEICA RM 2145; Leica Instruments GmbH, Nussloch Heidelberg, Alemanha) equipado com lâmina de vidro (LEICA RM 2245) e coradas em Hematoxilina e Eosina. 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, utilizando o *software* “Motic Imagens Plus 2.0”.

Para a caracterização das fases do ciclo reprodutivo seguiu-se o protocolo proposto por Brown-Peterson *et al.*, (2011). O Índice Gonadosomático (IGS) foi calculado utilizando a relação da massa gonadal (Wg) em relação à massa corporal (Wb) do indivíduo, dada pela seguinte fórmula: $IGS = Wg/Wb \cdot 100$ (Vazzoler 1996).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software livre BioEstat 5.0. Inicialmente os dados foram submetidos a teste de homogeneidade de Barlett e teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificação das premissas necessárias para testes paramétricos. Posteriormente, as análises foram conduzidas por meio de Teste T-Student para a comparação entre pares mês a mês entre grupo temperatura ambiente e grupo 32°C. Para as análises das médias realizadas ao longo de todo o experimento, foram feitas análises de

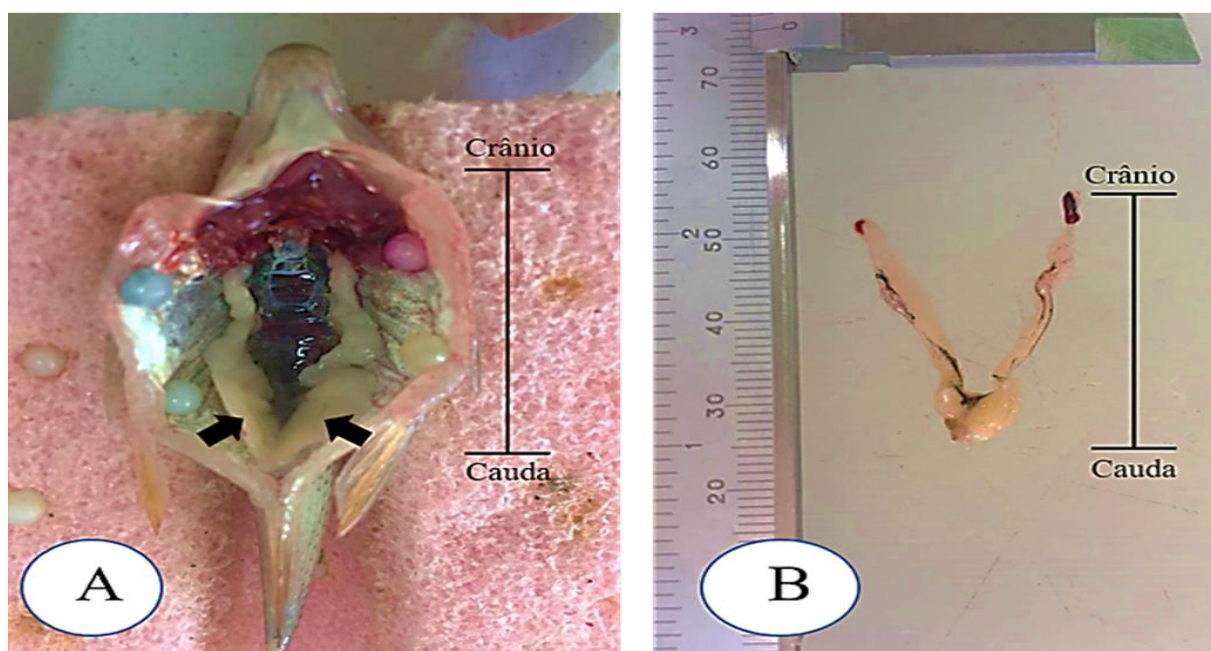
variância (ANOVA) one-way, seguidos de teste Tukey para as comparações múltiplas. Todos os dados são expressos nos gráficos ou tabelas por meio de médias e desvio padrão ($\pm$).

3. RESULTADOS

Características Macroscópicas

Os testículos de *Astyanax lacustris* são órgãos pares e alongados, dispostos na porção dorsal da cavidade abdominal, posicionando-se ventralmente ao sistema néfrico, e à bexiga natatória. Prolongam-se no sentido crânio-caudal e fundem-se na porção posterior formando o ducto espermático, que se estende até a abertura da papila urogenital (Fig. 08 A-B), canal este que posteriormente por meio da espermição os gametas são liberados para o meio externo.

Figura 07- Testículo de *Astyanax lacustris*. A- Posição dos testículos na cavidade abdominal; B- evidenciando a região cranial e caudal após a remoção.



Fonte: Própria autora.

Caracterização das fases testiculares

Com base nas características testiculares do espécime *A. lacustris*, mantidos a temperatura ambiente, foi possível caracterizar as seguintes fases: Apto a Espermição (Apto) e Regressão. Apto - subfase intermediário; Apto - subfase Final; Apto - subfase Final/ Regressão e Regressão - subfase Regressão/ Proliferação espermatogonial (Quadro 1). Nos espécimes mantidos na temperatura da água a 32°C, apesar de estarem muito na fase de Apto a

Espermição, foram observadas várias alterações no epitélio germinativo, sendo caracterizados as seguintes subfases: Apto - subfase intermediário; Apto - subfase Intermediário/ Regressão; Apto - subfase Intermediário/ vacúolos; Apto - subfase Final; Apto-subfase Final/ Regressão; Apto - subfase Final/ vacúolos e a fase Regressão. As características observadas em cada fase e subfases, assim como as particularidades de cada uma, estão descritas no Quadro 02.

Tabela 01- Descrição das fases observadas no epitélio germinativo de *Astyanax lacustris* durante o período experimental em animais sob temperatura ambiente.

Fase: Apto Espermição Subfase Apto Intermediário	Testículo com regiões do epitélio germinativo apresentando continuidades e descontinuidades. Cistos de todos os estágios na região que tem o EGC e espermatozoides na luz. Nas regiões com descontinuidade cistos escassos, dispersos, e uma luz ampla e repleta de espermatozoides.
Fase: Apto Espermição Subfase Apto Final	Epitélio todo descontínuo, podendo apresentar cistos dispersos, com regiões específicas com maior abundância de destes, com luz ampla e repleta de espermatozoides, apto a espermição.
Fase: Apto Espermição Subfase Apto Final/ Regressão	Epitélio todo descontínuo, região com luz ampla e repleta de espermatozoides. Na outra região descontinuidade, com presença de muitos vacúolos nas células de Sertoli, diminuição da proporção de espermatozoides na luz e o túbulo fragmentado.
Fase Regressão	Epitélio com escassez de cistos, muitos vacúolos nas células de Sertoli e a luz com poucos espermatozoides.
Fase Regressão Subfase Regressão/proliferação	Epitélio todo descontínuo, porém observa-se proliferação espermatogonial em regiões específicas, e outras com total aspecto de epitélio em regressão.

Fonte: adaptado de Brow-Peterson *et al.*, 2011.

Tabela 02- Descrição das fases observadas no epitélio germinativo de *Astyanax lacustris* durante o período experimental 32°C.

Fase: Apto Espermição Subfase Apto Intermediário	Testículo com regiões do epitélio germinativo apresentando continuidades e descontinuidades. Cistos de todos os estágios na região que tem o EGC e espermatozoides na luz. Nas regiões com descontinuidade cistos escassos, dispersos, e uma luz ampla e repleta de espermatozoides.
Fase: Apto Espermição Subfase Apto Intermediário/Vacúolos	Presença de vacúolos no epitélio.
Fase: Apto Espermição Subfase Apto Final	Epitélio todo descontínuo, podendo apresentar cistos dispersos, com regiões específicas com maior abundância de destes, com luz ampla e repleta de espermatozoides, apto a espermição.
Fase: Apto Espermição Subfase Apto Final/Vacúolos	Presença de vacúolos no epitélio.
Fase: Apto Espermição Subfase Apto Inter/Regressão	Epitélio germinativo heterogêneo, com regiões apresentando continuidades e aspectos de epitélio em regressão (descontinuidade, células epiteliais com bastante vacúolo, espermatozoides residuais).
Fase: Apto Espermição Subfase Apto Final/Regressão	Epitélio todo descontínuo, região com luz ampla e repleta de espermatozoides. Na outra região descontinuidade, com presença de muitos vacúolos nas células de Sertoli, diminuição da proporção de espermatozoides na luz e o túbulo fragmentado.
Fase Regressão	Epitélio com escassez de cistos, muitos vacúolos nas células de Sertoli e a luz com poucos espermatozoides.

Fonte: adaptado de Brow-Peterson *et al.*, 2011.

Figura 08- Testículo de *Astyanax lacustris*, fases e subfases apresentadas na Temperatura Ambiente: A e B: Fase Apto espermição- subfase- Intermediário: A- Epitélio germinativo apresentando continuidades e descontinuidades. Cistos de todos os estágios na região que tem o EGC e espermatozoides na luz. Nas regiões com descontinuidade cistos escassos, dispersos, e uma luz ampla e repleta de espermatozoides. B-Cistos de todos os estágios no epitélio germinativo e presença de espermatozoides no lúmen. C e D: Fase Apto-subfase-Final: C- Epitélio germinativo descontínuo, cistos dispersos, com regiões específicas com maior abundância destes, luz ampla e repleta de espermatozoides, apto a espermição. D-Epitélio germinativo descontínuo, presença de cistos de espermatídes, células de Sertoli e a luz repleta de espermatozoides. E e F: Fase Apto -subfase- Final/ Regressão: E- Em uma região, epitélio germinativo descontínuo, luz ampla e repleta de espermatozoides. Na outra região descontinuidade, com presença de muitos vacúolos nas células de Sertoli, diminuição da proporção de espermatozoides na luz e o túbulo fragmentado. F-Epitélio germinativo descontínuo, espermatozoides na luz, vacúolos nas células de Sertoli e no epitélio. G e H: Fase Regressão: G- Epitélio germinativo com escassez de cistos, muitos vacúolos nas células de Sertoli e a luz com poucos espermatozoides. H- Muitos vacúolos nas células de Sertoli e a luz com poucos espermatozoides. I e J: Fase regressão-subfase- Regressão com proliferação espermatogonial: I- Epitélio germinativo todo descontínuo, proliferação espermatogonial em regiões específicas, e outras com total aspecto de epitélio em regressão. J- Presença de espermatogônias, células de Sertoli e espermatozoides residuais. **Seta verde:** epitélio germinativo contínuo, **seta vermelha:** epitélio germinativo descontínuo, **seta azul:** células de Sertoli, *: vacúolos, **L:** lúmen, **spZ:** espermatozoides, **spC:** espermatocitos, **spM:** espermatídes e **spG:** espermatogônias. Coloração (HE): Hematoxilina/Eosina.

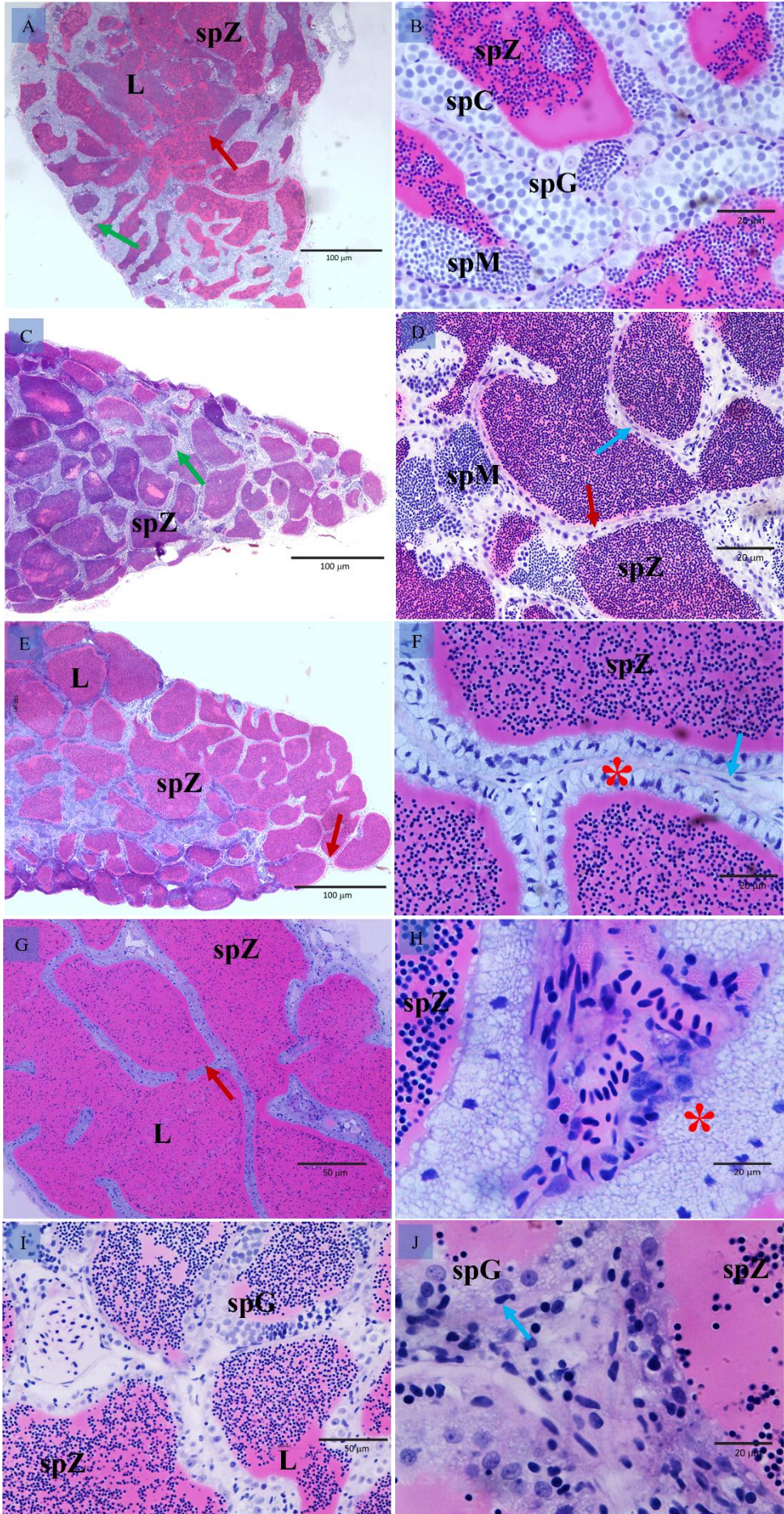
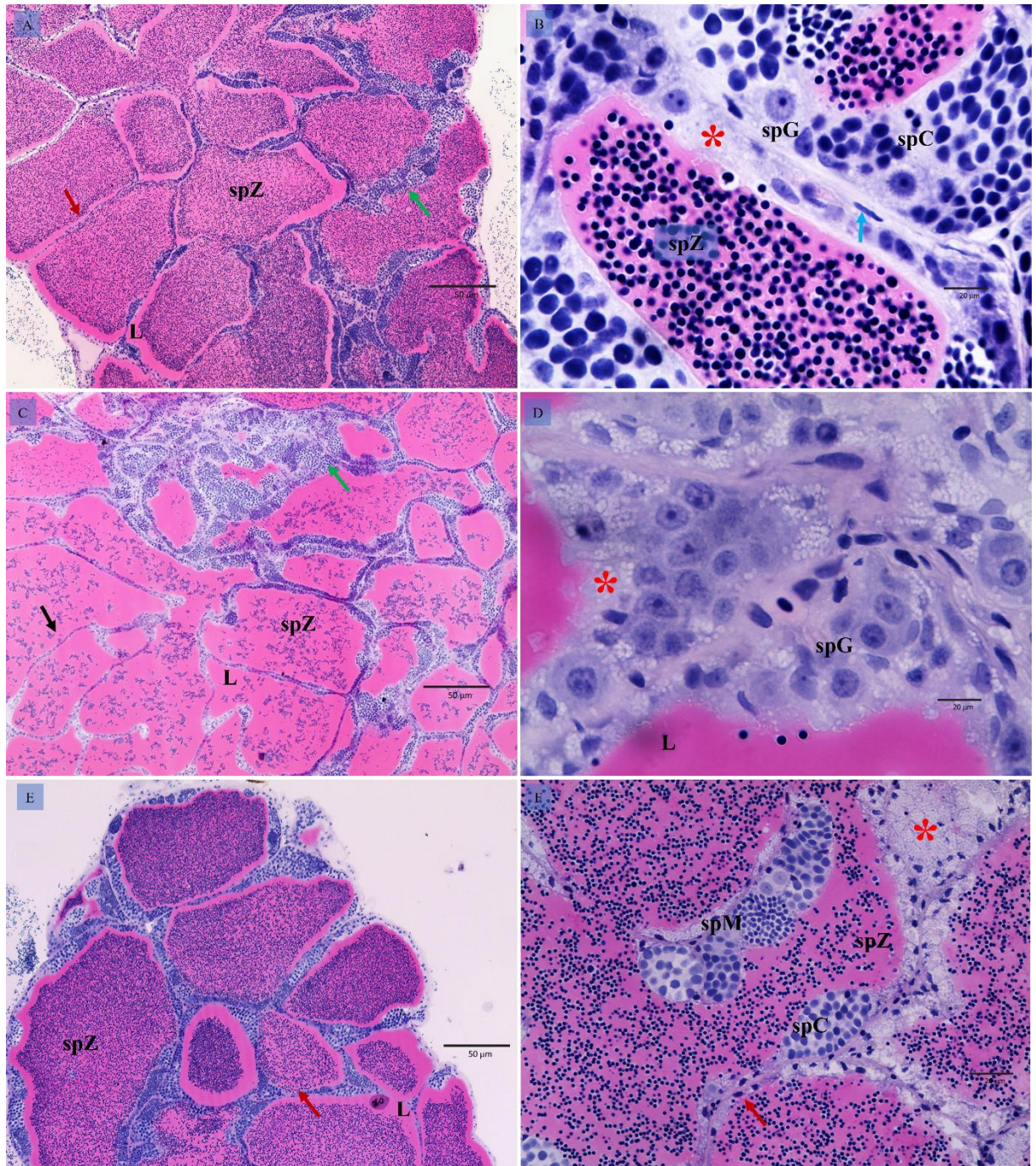


Figura 09- Testículo de *Astyanax lacustris*, fases apresentadas na Temperatura de 32°C. A e B: Fase espermição-subfase- Intermediário/ Vacúolos: A-Testículo com regiões do epitélio germinativo apresentando continuidades e descontinuidades. Cistos de todos os estágios na região que tem o EGC e espermatozoides na luz. Nas regiões com descontinuidade cistos escassos, dispersos, e uma luz ampla e repleta de espermatozoides. B- Presença de espermatogônia, cistos de espermatócitos, epitélio germinativo com vacúolos, células de Sertoli e espermatozoides na luz. C e D: Fase Apto-subfase- Intermediário/ Regressão: C- Epitélio germinativo com regiões apresentando continuidades e aspectos de epitélio em regressão, células epiteliais com bastante vacúolo e espermatozoides residuais. D- Espermatogonias com presença de vacúolos e espermatozoides residuais. E e F: Fase Apto -subfase- Final/ Vacúolo: E- Epitélio germinativo descontínuo, apresentando cistos dispersos, com regiões específicas com maior abundância, com luz ampla e repleta de espermatozoides, apto a espermição. F- Apresentando epitélio germinativo descontínuo, cistos de espermatocistos, cistos de espermátides, espermatozoides e vacúolos no epitélio. **Seta verde:** epitélio germinativo contínuo, **seta vermelha:** epitélio germinativo descontínuo, **seta azul:** células de Sertoli, **seta preta:** aspecto de regressão no epitélio, *****: vacúolos, **L:** lúmen, **spZ:** espermatozoides, **spC:** espermatocistos, **spM:** espermátides e **spG:** espermatogônias. Coloração (HE): Hematoxilina/Eosina.



Fonte: Própria autora.

Distribuição de animais por fases do desenvolvimento testicular

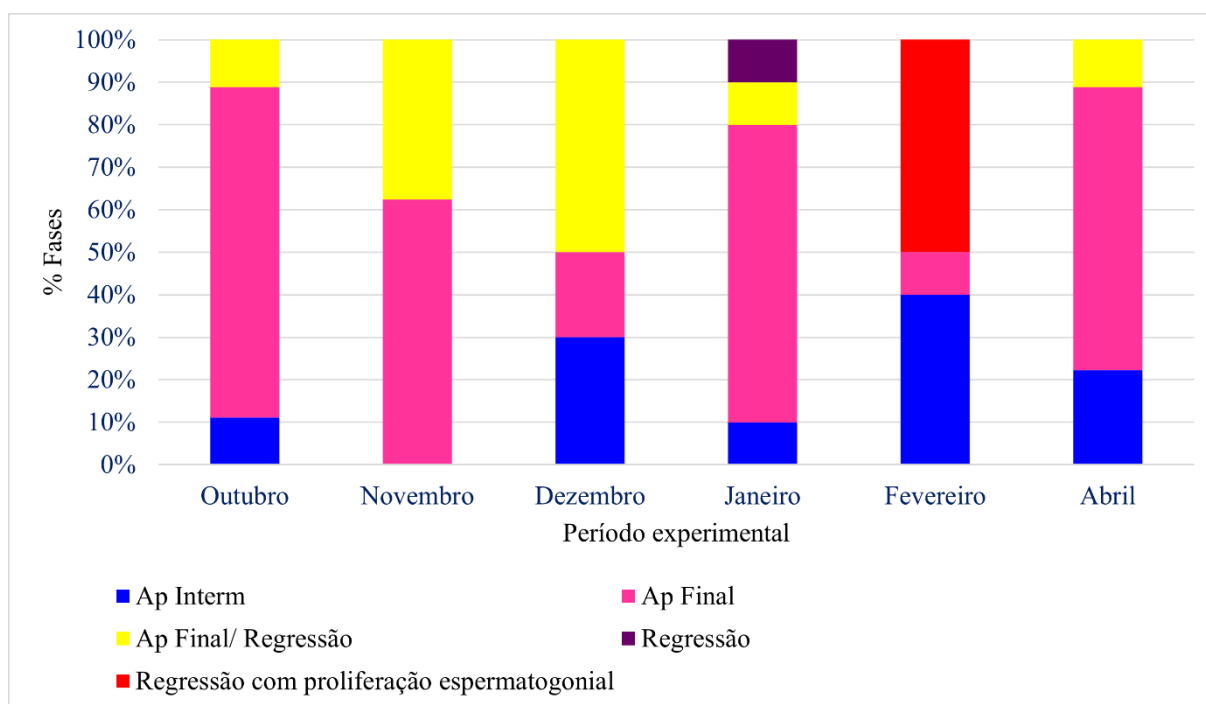
Ao longo dos meses foi possível observar, nos espécimes, as variações nas porcentagens das diferentes fases do desenvolvimento testicular, em ambas as temperaturas (Figs. 10 e 11). Nos espécimes mantidos à temperatura ambiente outubro/19 apresentou apenas animais na fase apto a espermição com três subfases (apto intermediário, apto final e apto final/ regressão). Em novembro/19 foi observado apenas a fase apto a espermição, e as subfases apto final e apto final/regressão, com maior predominância de espécimes na subfase apto final. Em dezembro/19 apresentou a mesma fase e subfases dos espécimes no mês de outubro/19.

Seguindo o período experimental, o mês de janeiro/20 apresentou duas fases (Apto a espermição com subfases) e a fase regressão. Em fevereiro/20 apresentou duas fases Apto a espermição, sendo as subfases Apto intermediário e apto final e a fase regressão com subfase regressão com proliferação espermatogonial. Já abril/20, apresentou as mesmas fases e subfases dos espécimes analisados em outubro/19, assim como dezembro, demonstrando assim atividade cíclica do período reprodutivo e a capacidade rápida de autorrenovação do epitélio germinativo da espécie (Fig. 10).

Entretanto, quando observamos a porcentagem de distribuição das subfases Apto final nos espécimes mantidos a 32°C, verificamos que ocorreu uma redução quando comparada com a temperatura ambiente, além de alterações morfoestruturais no epitélio de alguns espécimes. Por exemplo, em outubro/19 foi possível observar espécies na fase Apto a espermição, duas novas subfases, Apto final/vacúolos e Apto Intermediário/vacúolos.

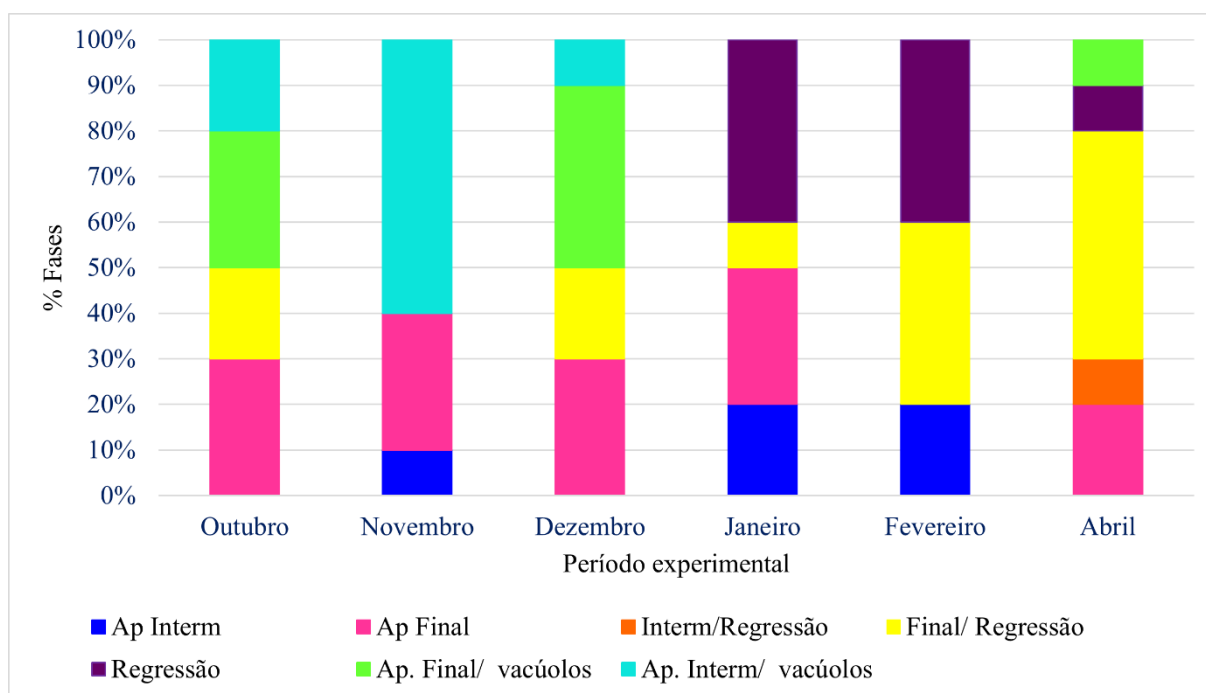
No mês de novembro/19 apresentou a fase Apto a espermição com predomínio da subfase Apto intermediário/vacúolos. Em dezembro/19 foi observado a fase Apto a espermição com predomínio da subfase Apto final/vacúolos. Em janeiro/20 por sua vez foi observado duas fases Apto a espermição com subfases e a fase regressão apresentando maior predominância. No mês de fevereiro/20 foi observado a fase apto a espermição com subfases e a fase regressão mais predominante. Por fim, em abril/20 foi observado duas fases apto a espermição com subfases diferentes sendo Apto final, Apto intermediário/regressão, apto final/ vacúolos, tendo a predominância da final/regressão e a fase regressão (Figs. 10 e 11).

Figura 10- Frequência de espécimes de *Astyanax lacustris* por fases de maturação testicular para temperatura Ambiente, dos meses de outubro/19 a abril/20.



Fonte: Própria autora.

Figura 11- Frequência de espécimes de *Astyanax lacustris* por fases de maturação testicular para temperatura de 32°C, dos meses de outubro/19 a abril/20.



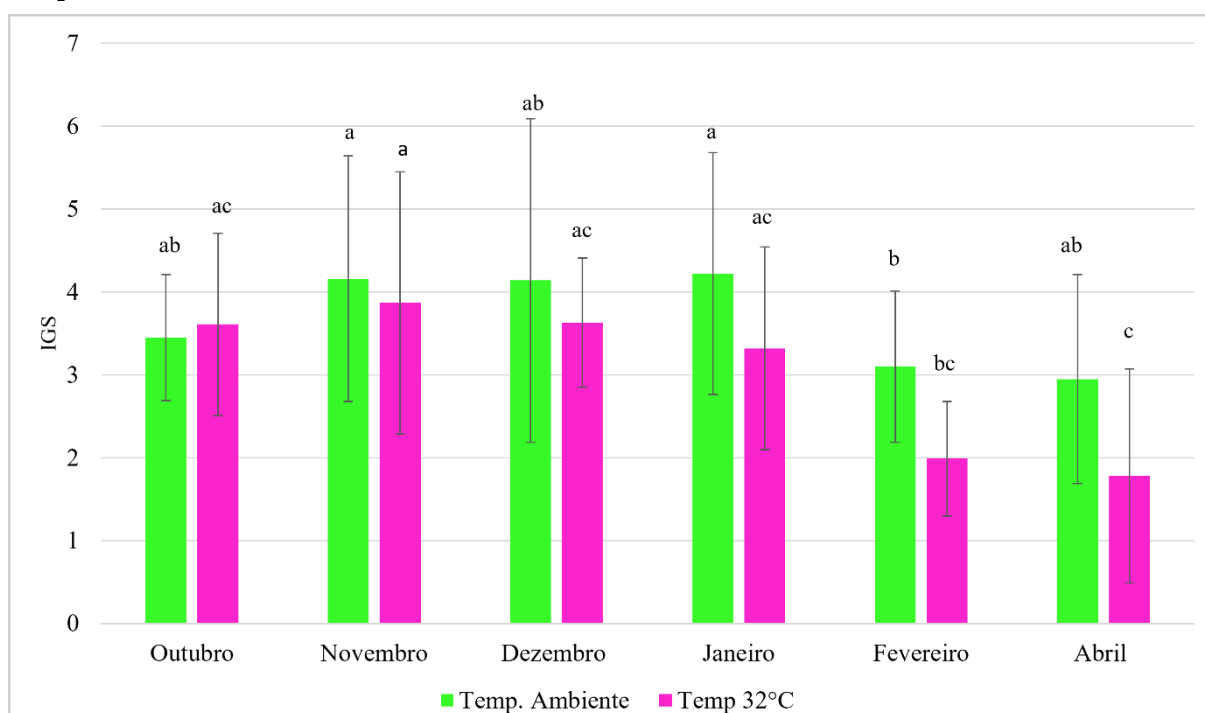
Fonte: Própria autora.

ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO

Os espécimes do tratamento controle (temperatura ambiente), apresentaram variações do IGS durante o período experimental, com diferença significativa ($p < 0,05$), apresentando picos nos meses de novembro/19 e janeiro/20, com as respectivas médias $4,15 \pm 1,48$ e $4,22 \pm 1,46$. Decréscimos nas médias do IGS foram observados no mês de fevereiro/20, com o IGS ($2,09 \pm 0,91$). Também foi observada diferença significativa entre os meses de novembro/19 e fevereiro/20, assim como janeiro/20, quando comparado com fevereiro/20, $p < 0,05$ respectivo para os meses comparados (Fig. 12).

Os animais submetidos a temperatura de 32°C , também apresentaram variações significativas nas faixas do IGS durante o período experimental ($p < 0,05$), com pico nos meses de outubro/19 ($3,61 \pm 1,10$) e novembro/19 ($3,86 \pm 1,58$), e assim como o controle, também, apresentou decréscimo na média do índice nos meses de fevereiro/20 ($1,97 \pm 0,63$) e abril/20 ($1,78 \pm 1,29$). Ao longo do período, na temperatura de 32°C foi possível identificar que houve diferença estatística significativa entre os meses de outubro/19 e fevereiro/20; novembro/19 e abril/20; e novembro/19 e fevereiro/20 (Fig. 12). Não houve diferença entre os tratamentos temperatura T.A e 32°C , porém quando comparado os meses dentro de cada temperatura houve diferença estatística (Fig. 12).

Figura 12- Índice Gonadossomático (IGS) de *Astyanax lacustris* em temperatura ambiente (controle) e sob tratamento (32°C). As letras indicam diferença entre os meses para cada temperatura.



Fonte: Própria autora

4. DISCUSSÃO

A morfologia testicular da espécie, segue o padrão já observado para vários grupos de teleósteos (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2017). Macroscopicamente os testículos são órgãos alongados, aos pares de forma a se posicionarem ventralmente ao sistema néfrico, e rente à bexiga natatória (Quirino, 2017), afunilando-se no sentido craniocaudal, formando assim o ducto espermático, que desemboca na papila urogenital (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2017).

A descrição das particularidades da estrutura testicular, pode determinar quais estratégias reprodutivas são adotadas pela espécie (LO NOSTRO *et al.*, 2003a). Uma vez que o comportamento dos peixes é tão diversificado, quanto a morfologia dos mesmos (NELSON 2016). A diversidade também se reflete nas diferentes estruturas gonadais, estratégias reprodutivas e modos de cuidado parental encontrados neste grupo (NAGAHAMA 1983; PUDNEY 1995, 1996; NAKATANI *et al.*, 2001).

Seguindo um padrão conservativo, como o observado em vertebrados, o testículo nos peixes é composto por dois compartimentos principais, o germinativo e o intersticial (SCHULZ *et al.*, 2009), sendo também observado para a espécie em questão. Nessa espécie, o compartimento germinativo apresenta uma organização do tipo tubular anastomosado (GRIER, 1980), com uma dinâmica de alterações recorrentes, de acordo com a maturação das células presentes no epitélio, apesar do ciclo reprodutivo (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2017).

Em relação ao compartimento intersticial os tipos celulares que caracterizam essa região são facilmente identificados, como as células de Leydig, macrófagos, fibras de colágeno e vasos sanguíneos. Por ser um padrão conservativo característico do epitélio germinativo em teleósteos, em Perciformes (*Cichlasoma dimerus*), esses tipos celulares são facilmente identificados ao longo do ano. Sendo que as células de Leydig são mais facilmente observadas desde a fase proliferativa até a fase de maturação, coincidindo com a ausência de espermatozoides no cisto (VÁZQUEZ *et al.*, 2012).

No presente trabalho, a terminologia original foi adaptada e aplicada, concordando com a ideia de uma universalização da classificação do ciclo reprodutivo para machos. Sendo assim, de acordo com as características do epitélio germinativo, com a presença ou ausência de continuidade ou descontinuidade (GRIER, 2000; GRIER; LO NOSTRO, 2000) não foram identificados indivíduos nas fases iniciais (imaturo). A ausência das fases durante o período experimental, pode ser explicada devido a biologia reprodutiva da espécie, uma vez que apresentam curtos ciclos reprodutivos e intermitentes (três a quatro vezes ao ano) (CASTILHO-ALMEIDA, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2012).

Foram observados independentemente do tratamento ao qual estavam submetidos (ambiente/32°C) apenas animais com epitélio característico da fase “Apto a espermição”, com subfases distintas. Com maior ocorrência entre nos meses que compreendem a primavera e verão. Essa característica corresponde com o pico de reprodução da espécie, que mesmo sendo de reprodução intermitente, apresenta picos de reprodução que compreendem os meses de setembro a março (PORTELLA *et al.*, 2021). Sendo testículos grandes e firmes, com presença de todos os estágios da espermatogênese. Espermatocistos em todo o testículo, espermatogênese ativa, epitélio germinativo contínuo ou descontínuo, espermatozoide no lúmen

Essas características corroboram com o observado em *Pimelodus maculatus*, que apresentam o mesmo tipo testicular da espécie em estudo, onde uma vez dado o start para o início do processo espermatogênico como um todo, o epitélio germinativo passa a apresentar modificações em sua estrutura, uma vez que com o prosseguimento do mesmo, as membranas que envolvem os espermatocistos se abrem, direcionando os agora espermatozoides para o lúmen dos túbulos seminíferos (SANTANA; QUAGIO-GRASSIOTTO 2014).

A presença de estruturas análogas a vacúolos, associadas às células de Sertoli em animais sob tratamento (32°C), podem justificar a as menores médias observadas na análise do IGS quando comparada com os animais sob temperatura ambiente. Para outras espécies de vertebrados, um dos principais sinais anomalias associadas às células de Sertoli, são as vacuolizações precocemente observadas no citoplasma das mesmas. Que podem surgir devido à retenção de espermátides ou falhas na espermição (RUSSEL; GRISWOLD, 1993).

Essas faixas nos valores do IGS, são reflexos das condições do epitélio germinativo, indicando que o aumento da temperatura por um determinado tempo, estimula a cinética espermatogênica, uma vez que foi notável a presença de exemplares nas fases apto final e final/regressão, em relação aos animais que foram mantidos em controle após sessenta dias de experimento. Indicando que a temperatura elevada induz ao aumento da proliferação celular (QUIRINO *et al.*, 2021).

Resultados semelhantes foram observados em um estudo com *Lepomis gibbosus* coletados em um reservatório de água de resfriamento associado a uma usina nuclear (37°C), indicou que, em ambos os sexos, o desenvolvimento gonadal da espécie no reservatório aquecido foi mais avançado do que no rio mais frio durante a estação reprodutiva (VALENTE *et al.*, 2016).

Em contrapartida, com o decorrer do experimento, foi evidenciado que possivelmente, a exposição prolongada, pode afetar a manutenção das células responsáveis pela renovação

epitelial, levando a um retardo nas condições do mesmo, uma vez que após os primeiros trinta dias de experimento, as médias do IGS de animais sob tratamento, apresentaram um declínio gradativo. Alterações semelhantes foram observadas quando comparado o IGS de *Cyprinodon variegatus* em condições anormais de temperatura (37°C), onde a exposição por um período de 14 dias afetou diretamente o desempenho reprodutivo da espécie, tanto em machos como em fêmeas (BOCK *et al.*, 2021).

Trazendo para isso para ambiente natural, a elevação da temperatura a extremos térmicos, pode implicar no comprometimento reprodutivo de algumas populações de peixes, podendo levar populações inteiras a entrar em colapso, devido à reprodução e recrutamento comprometidos à medida que os ambientes aquecem sob as mudanças climáticas, antes mesmo que algumas dessas populações experimentem temperaturas altas o suficiente para causar mortalidade direta (ALIX *et al.*, 2020).

Em juvenis machos de *Oncorhynchus mykiss*, após três meses de experimento, não foi observado diferenças estatísticas em um cenário de aquecimento da água, porém muitos machos sob tratamento apresentaram gônadas atrofiada e não desenvolvidas, ou um testículo menor com menor volume seminal (BUTZGE *et al.*, 2021). Com subtende-se que com a manutenção prolongada de exemplares a 32°C, afeta o epitélio germinativo, uma vez que os testículos não conseguem repor o estoque necessário de células para sua renovação.

O IGS não correspondeu fielmente a fase reprodutiva apto a espermição analisada histologicamente. Nos meses de abril/20 para ambas as temperaturas, os valores foram os mais baixos T.A 2,95 e 32°C 1,78, podendo levar a uma interpretação errônea do desenvolvimento morfológico quando não associado a uma análise mais refinada. Segundo Gomes-Silva (*et al.*, 2019), trabalhando com *Brycon orbignyanus* diferenças do índice gonadossomático podem ser observadas dentro das fases havendo uma faixa de variação, dentro da mesma fase reprodutiva.

Contudo, esses resultados nos mostram que mesmo após a exposição prolongada, e com um decréscimo gradativo no IGS, o animal apresenta uma certa plasticidade de se adaptar a temperatura elevada e continuar a atividade espermatogênica, uma vez que há a presença de células germinativas ao longo do ciclo. Machos de *Devario aequipinnatus* expostos a temperatura de 30°C apresentaram uma redução na quantidade de cistos germinativos, refletindo diretamente nas espermatogônias, mas não houve a completa depleção das células germinativas (CHAGAS, 2015).

Em um estudo realizado com juvenis de *Brycon orbignyanus* submetidos a quatro diferentes temperaturas (24°C, 27°C, 30°C e 33°C), foi observado que a 24°C os animais apresentaram grande estresse, evidenciado pelo aumento da agressividade, do canibalismo

oportunista e uma menor taxa de ganho de massa. No entanto, em temperatura de 30°C e 33°C os animais apresentaram maior taxa de ganho de massa e crescimento, sendo indicado neste estudo que a temperatura ideal de cultivo de juvenis para esta espécie pode ser acima de 30°C (SANTOS, 2018).

A supressão da espermatogênese em *Astyanax lacustris* com a elevação das temperaturas de 28°C para 35°C, já foi relatada anteriormente, onde a situação de estresse térmico, acelerou consideravelmente processo que o epitélio esgotou suas células de repovoamento, levando o testículo a suprimir a quantidade de divisões meióticas (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2015). Fato não observado nesse trabalho, onde ficou evidenciado que a exposição por um tempo prolongado a temperatura de 32°C, pode reduzir a capacidade proliferativa, mas não a supressão do processo como um todo, uma vez que o epitélio do mesmo consegue manter o processo.

A presença de estruturas semelhantes a vácuos presentes no citoplasma das células de Sertoli dos animais sob estresse termal (32°C), podem comprometer a funcionalidade da mesma. A presença dessa estrutura no epitélio, anteriormente já foi observada em *Oreochromis niloticus*, em tratamentos com 36°C e 37°C, onde os autores observaram vacuolização, assim como uma redução dos cistos de espermátides, e uma atrofia do epitélio como um todo (JIN *et al.*, 2019)

Os resultados apresentados aqui e em outros lugares para outras espécies (por exemplo, ALIX *et al.*, 2020; SERVILI *et al.*, 2020; BUTZGE1 *et al.*, 2021) têm um papel crucial a desempenhar, servindo como uma base para orientar pesquisas futuras sobre como as temperaturas extremas previstas para o clima futuro terão impacto na reprodução dos peixes.

REFERÊNCIAS

- BARRETO, B. P.; RATTON, T. F.; RICARDO, M. C. P.; ALVES, C. B. M.; VONO, V.; VIEIRA, F.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Biologia reprodutiva do lambari *Astyanax bimaculatus* (Pisces: Characidae) no rio do Carmo, bacia do rio Grande, São Paulo. **Bios**, v. 6, n. 6, p. 121-130, 1998.
- BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A Standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, Chichester, v. 3, p. 52–70, 2011.
- CASTILHO-ALMEIDA, R. B. *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação. 2007. 119 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- CHAGAS, J. M. A.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Ciclo testicular de *Devario aequipinnatus* (Teleostei: Cyprinidae): um potencial modelo biológico em experimentação animal. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 766-780, 2016.
- GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC-RS. Série Zoologia**, [Porto Alegre], v. 13, p. 65-88, 2000.
- LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NOBREGA, 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**, Madison, v. 81, p. 77-187, 2009.
- LUO, S.; JIN, S.; SU, L.; WANG, J. Effect of water temperature on reproductive performance and offspring quality of rare minnow, *Gobiocypris rarus*. **Journal of Thermal Biology**, Wuhan, v. 67, p. 59-66, 2017.
- PANKHURST, N. W.; PÖRTER, M. J. R. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, New York, v. 28, p. 385-389, 2003.
- PARENTI, R. L.; GRIER H. J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and Comparative Biology**, McLean, v. 44, p. 333–348, 2004.
- PORTO-FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura em Santa Maria**. Santa Maria: Ed UFMS, 2005. 468 p.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; WILDNER, D. D.; ISHIBA, R. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p.181-191, 2013.

QUIRINO, P. P. **As implicações da elevação da temperatura na duração da espermatogênese em *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae)**. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

RIBEIRO, C. S.; MOREIRA, R. G. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 8, p. 58-61, 2012.

SABBAG, O. J.; TAKAHASHI, L. S.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; ARANHA, A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo-amarelo em Monte Mastelo/SP: um estudo de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 307-315, 2011.

SANTOS, G. M.; MÉRONA, B.; JURAS, A. A.; JÉGU, M. **Peixes do baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da usina hidrelétrica Tucuruí**. Brasília: Eletronorte, 2004. 216 p.

SANTOS, T. M. L. **Influência da temperatura sobre o desenvolvimento de juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2018. 58 f. Dissertação. (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

SCHLEGER, I. C.; PEREIRA, D. M. C.; RESENDE, A. C.; ROMÃO, S.; HERRERIAS, T.; NEUNDORF, A. K. A.; SLOTY, A. M.; GUIMARÃES, I. M.; SOUZA, M. R. P.; CARSTER, G. P.; DONATTI, L. Cold and warm waters: energy metabolism and antioxidant defenses of the freshwater fish *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) under thermal stress. **Journal of Comparative Physiology B**, Curitiba, p. 1-18, 2021.

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

SILVA, J. V.; ANDRADE, D. V.; OKANO, W. Y. Desenvolvimento sexual e crescimento de lambaris – tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 submetidos a diferentes tipos de alimentação. **Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, p. 47-54, 1996.

SILVA, P.; ROCHA, M. J.; CRUZEIRO, C.; MALHÃO, F.; REIS, B.; URBATZKA, R.; MONTEIRO, R. A. F.; ROCHA, E. Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads—A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 124, p. 1– 10, 2012.

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

WALTER, M. K. C. Mudanças climáticas: uma verdade inconveniente. **Revista Multiciência**, Campinas, ed. 8, p. 169-172, 2007.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os espécimes em temperatura ambiente e de 32°C apresentaram as mesmas fases Apto a espermição e regressão, tendo diferenças nas subfases para cada temperatura. Com relação à elevação da temperatura da água, podemos concluir que ela acelerou o processo de espermatogênese e as células de Sertoli apresentam vacúolos, provavelmente as células germinativas. Teve mais a fase regressão e presença de vacúolos nos animais de temperatura de 32°C. Os vacúolos não foram observados em animais que estavam a temperatura ambiente. Uma região praticamente do testículo não retornou, ou demorando para retornar, justamente pela presença de vacúolos, e por não apresentar cistos, ou com ter aspecto de regressão. Apresentando praticamente uma depleção.