



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

As implicações da elevação da temperatura na duração da espermatogênese em
Astyanax altiparanae (Characiformes, Characidae)

Patricia Postingel Quirino

Botucatu – SP
2017



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

As implicações da elevação da temperatura na duração da espermatogênese em
Astyanax altiparanae (Characiformes, Characidae)

Patricia Postingel Quirino

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
2017

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

Quirino, Patricia Postingel.

As implicações da elevação da temperatura na duração da espermatogênese em *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae) / Patricia Postingel Quirino. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Rosicleire Veríssimo Silveira

Capes: 20400004

1. *Astyanax* (Peixe) - Reprodução. 2. Lambari (Peixe) - Reprodução. 3. Bromodesoxiuridina. 4. Espermatogônias. 5. Espermatogênese.

Palavras-chave: Bromodeoxiuridina; Espermatogônias; Lambari; Reprodução.

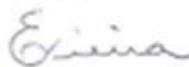
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PATRICIA POSTINGEL QUIRINO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 31 dias do mês de julho do ano de 2017, às 14:00 horas, no(a) Sala de Vídeo Conferência 02 (ADM) - Campus Central/Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/FEIS, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA - Orientador(a) do(a) Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, Prof. Dr. EDSON GUILHERME VIEIRA do(a) Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, Prof. Dr. DANIELA CARVALHO DOS SANTOS do(a) Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP (através de Videoconferência), sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de PATRICIA POSTINGEL QUIRINO, intitulada *As implicações da elevação da temperatura na duração da espermatogênese em Astyanax altiparanae (Characiformes, Characidae)*. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

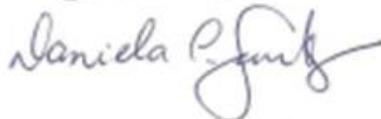
Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA



Prof. Dr. EDSON GUILHERME VIEIRA



Prof. Dr. DANIELA CARVALHO DOS SANTOS



Dedico este trabalho ao capricorniano mais teimoso e paciente que eu conheço, meu pai, Luiz Antônio; à canceriana mais dramática e amorosa do mundo, minha mãe, Rozângela; ao libriano mais justo e leal de todos, meu irmão, Luiz Fernando. Aos amores da minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e aos bons espíritos por sempre me acompanharem;

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

Aos funcionários da Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, por todo apoio;

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

A CAPES - Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – pela bolsa de estudos concedida;

A minha orientadora e minha mãe científica, Rosicleire Veríssimo Silveira, por cada ensinamento, cada palavra de apoio ou bronca, quando foram necessárias. Obrigada por ser parte fundamental da minha vida e por ser muito mais do que uma orientadora;

Ao meu professor e pai científico, Alexandre Ninhaus Silveira, por me mostrar – mesmo sem ter notado – que a vida pode ser difícil e mesmo assim ser leve e feliz! Obrigada, por ser, junto com a Rosi, muito mais do que professores, mas companheiros para o resto da vida;

Aos meus pais, Luiz Antônio Quirino e Rozângela Postingel Quirino, por absolutamente tudo. Mesmo com toda riqueza e beleza da Língua Portuguesa, desconheço palavras que possam definir o que vocês são para mim. Acredito que tudo pode ser resumido em “AMO VOCÊS” e tudo isso é POR VOCÊS;

Ao meu irmão, Luiz Fernando Postingel Quirino, por ser um exemplo de lealdade, justiça e amizade;

A minha prima-irmã, Ana Caroline Postingel Zuccolin, que mesmo distante fisicamente, esteve presente o tempo todo. Obrigada por dividir tristezas, rir das minhas compras (que não deveriam ter sido feitas) e por seguir a vida comigo;

A Silvia Adriana, que entrou nas nossas vidas pra trazer alegria, agradeço por toda ajuda neste ano que passou conosco. Sua presença tornou os dias mais coloridos e brandos;

A todos os meus amigos, que me acolheram no coração, me guardaram na vida e me amam sem cobrança. Por que algumas vezes, a distância e ausência se fazem presentes, e mesmo assim, estão sempre comigo. Em especial, agradeço a Paula Carneiro, Paula Araújo, Heloísa, Jéssica, Lorena, Mariana, Mariane, Vanessa, Nina, Tuty, Giovana, Jaqueline Queiroz, Mayara Ribeiro, Jaqueline Ramos, Bianca de Freitas, Ronaldo, Lumena e Ricardo Almeida. *“Os laços do corpo formam famílias consanguíneas, mas os laços do sentimento formam famílias espirituais”* (Gabriel Martins, 2011);

Aos meus companheiros de laboratório, por cada ajuda, cada aprendizado, cada ação em conjunto, este trabalho tem um pedacinho de vocês. Um agradecimento especial a Diógenes, Maira, Raphael, por sempre me darem uma mãozinha científica; a Amanda, Geovanna, Cris e Elis por serem as melhores companhias que eu poderia ter ao longo do mestrado, por aguentarem as minhas cantorias, meu gosto musical extremamente peculiar, por rirem das minhas gracinhas e, principalmente, por terem se tornado parte da minha família, amo vocês;

Aos funcionários do Departamento de Biologia e Zootecnia – FEIS, Meire, Vera, Júnior, Wilder e Sidival por todo papo informal e por todas as vezes que me socorreram;

Ao doutorando Arno Butzge e ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega pela ajuda nos procedimentos de imunodeteção, por todo conhecimento passado e pelas ótimas conversas informais;

A Giovana Branco, por todas as recepções calorosas, pelo carinho, atenção e amizade sincera;

Aos mestres da MPB, que já se foram e aos que estão vivos, e mesmo sabendo que jamais verão este agradecimento, não poderia deixar de fazê-lo, tendo em vista que estiveram comigo ao longo de todo esse trabalho;

A cada pessoa que cruzou com os meus passos, aquelas que permaneceram na minha vida e aquelas que foram embora por algum motivo, minha história é escrita com cada um de vocês! OBRIGADA!

Há um menino
Há um moleque
Morando sempre no meu coração
Toda vez que o adulto balança
Ele vem pra me dar a mão

Há um passado no meu presente
Um sol bem quente lá no meu quintal
Toda vez que a bruxa me assombra
O menino me dá a mão

E me fala de coisas bonitas
Que eu acredito
Que não deixarão de existir
Amizade, palavra, respeito
Caráter, bondade alegria e amor

Milton Nascimento

RESUMO

Frente ao cenário de mudanças climáticas estabelecidas e conseqüentemente às alterações da temperatura global, torna-se essencial estudar os seus efeitos na espermatogênese dos animais. Sendo assim, objetivou-se caracterizar morfológica e estereologicamente os tipos celulares encontrados na espermatogênese do lambari *Astyanax altiparanae*, além de determinar as fases testiculares e a verificar a duração da espermatogênese em diferentes temperaturas. Para tal, noventa e seis espécimes machos e adultos de *A. altiparanae* foram mantidos em sistema de circulação fechada sob temperatura da água estabilizada à 27°C (temperatura de conforto) e 32°C. Posteriormente, os espécimes receberam pulsos de BrdU (bromodeoxiuridina) na concentração de 100 mg/Kg/dia por 2 dias consecutivos, sendo as coletas realizadas diariamente por um período de 15 dias. Os testículos foram removidos, fixados, processados, incluídos em historesina e seccionados a 3µm, submetidos a colorações de Hematoxilina/Eosina e a técnicas de imunodeteção de BrdU. Os resultados obtidos a partir da temperatura de conforto da espécie permitiram classificar as espermatogônias de *A. altiparanae* em A-indiferenciadas*, A-indiferenciadas, A-diferenciadas e espermatogônias B. Assim como, caracterizar o ciclo reprodutivo da espécie em Regredido, Maturação Inicial, Maturação Intermediária, Maturação Final e em Regressão. A duração da espermatogênese foi determinada em aproximadamente seis dias para animais em 27°C e um dia para animais em 32°C. A temperatura elevada também foi responsável por aumento de proliferação celular em cistos de espermátides, em espermatozoides e células em morte celular (células picnóticas).

ABSTRACT

In view of the scenario of the established climate changes and the consequent changes in the global temperature, it is essential to study its effects on animal spermatogenesis. Therefore, the objective of this work was to characterize, morphologically and stereologically, the cell types found in spermatogenesis of the yellow-tetra *Astyanax altiparanae*, to determine the testicular phases and to verify the spermatogenesis duration at different temperatures. For this purpose, ninety-six male and adult specimens of *A. altiparanae* were kept in a closed circulation system under water temperature stabilized at 27°C (comfort temperature) and 32°C. Subsequently, the specimens received pulses of BrdU (bromodeoxyuridine) at a concentration of 100 mg/kg/day for 2 consecutive days, and samples were collected daily during a period of 15 days. Their testes were removed, fixed, processed in historesin and sectioned in 3 µm, submitted to Hematoxylin/Eosin and to BrdU immunodetection. Partial results of the comfort temperature allowed to classify the *A. altiparanae* spermatogonia in Aind*, Aind, Adif and B. Moreover, the reproductive cycle of the species was classified in Regressed, Initial Maturation, Mid Maturation, Final Maturation and Regression. It was possible to conclude that the spermatogenesis duration was determined in approximately six days for animals at 27°C and one day for animals at 32°C. In addition, the elevated temperature was also responsible for increased cell proliferation in spermatids, spermatozoa, and in cell death (pyknotic cells).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Aplicação de BrdU em exemplares de <i>Astyanax altiparanae</i>	41
Figura 2: Disposição dos testículos de <i>Astyanax altiparanae</i>	42
Figura 3: Tipos espermatogoniais em <i>Astyanax altiparanae</i>	43
Figura 4: Fase meiótica ou espermatocitária em <i>Astyanax altiparanae</i>	44
Figura 5: Espermiogênese em <i>Astyanax altiparanae</i>	45
Figura 6: Fases do desenvolvimento testicular de <i>Astyanax altiparanae</i>	46
Figura 7: Fases do desenvolvimento testicular de <i>Astyanax altiparanae</i>	47
Figura 8: Índice Gonadossomático de <i>Astyanax altiparanae</i> em 27°C e 32°C.....	48
Figura 9: Frequência (quantidade) de espécimes de <i>Astyanax altiparanae</i> por fases de maturação testicular.	49
Figura 10: Tipos espermatogoniais em <i>Astyanax altiparanae</i> que retiveram BrdU em 27°C .	50
Figura 11: Duração da espermatogênese em <i>Astyanax altiparanae</i> a 27°C.....	51
Figura 12: Duração da espermatogênese em <i>Astyanax altiparanae</i> a 32°C.....	52
Figura 13: Análise estereológica da marcação celular na espermatogênese de <i>Astyanax altiparanae</i>	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Aspectos reprodutivos dos peixes.....	13
1.2	A influência da temperatura na reprodução e o atual cenário do clima global.....	15
1.3	A espécie modelo	18
1.4	Duração da espermatogênese através de imunodeteção com bromodeoxiuridina	19
2	OBJETIVO	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Animais.....	22
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Histologia.....	27
4.2	Análise do Índice Gonadosomático (IGS).....	30
4.3	Determinação da duração da espermatogênese (fase meiótica à fase espermiogênica)	31
4.4	Análise Estereológica.....	32
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	40
7	LISTA DE FIGURAS	41
8	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos reprodutivos dos peixes

A reprodução em peixes apresenta a maior diversidade de estratégias do que qualquer outro grupo de vertebrados (POUGH; JANES; HEISER, 2008). Fato que pode estar ligado a grande variedade de estratégias e táticas de ciclo de vida que permitiu sua adaptação a ambientes nos quais tanto as condições bióticas (disponibilidade de alimento, pressão de predação, etc.) quanto as abióticas (temperatura, fotoperíodo, oxigênio disponível, etc.) variam amplamente (VAZZOLER, 1996).

Frente a toda essa variabilidade, os peixes são capazes de alocar energia, via alimentação, e através de uma gama de estratégias, utilizarem parte da mesma transformando-a em prole, de modo a garantir seu sucesso reprodutivo. As adaptações que habilitam estes organismos a viverem nos diferentes ambientes se refletem diretamente nas inúmeras estratégias reprodutivas desenvolvidas que, por sua vez, refletem diretamente na morfologia das gônadas das diferentes espécies (GODINHO, 2007). Assim, o conhecimento das características morfológicas das gônadas constitui uma etapa básica e essencial para o entendimento da biologia reprodutiva das espécies (BAZZOLI; RIZZO, 1990; CREPALDI; 2006; QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER; ISHIBA, 2013).

Em peixes, os testículos são formados basicamente por dois compartimentos: o compartimento intersticial e o germinativo. O compartimento intersticial abriga as células de Leydig, responsáveis pela produção de esteroides, vasos sanguíneos, entre outros. Enquanto que o compartimento germinativo, como o próprio nome sugere, abriga as células germinativas, que resultarão na produção de espermatozoides, além das células de Sertoli, responsáveis principalmente pela sustentação e nutrição dos espermatocistos (GRIER, 1992; GRIER, 1993; SCHULZ; NÓBREGA, 2011).

Diferente do que ocorre em mamíferos (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001), em peixes, a espermatogênese (nome dado ao processo de formação dos gametas masculinos) ocorre em unidades funcionais chamadas espermatocistos (GRIER, 1993), que são constituídos por grupos de células germinativas em um mesmo estágio de desenvolvimento, circundados por projeções citoplasmática das células de Sertoli (GRIER et al., 1980; GRIER, 1992, GRIER; TAYLOR, 1998; SCHULZ et al., 2010). Assim, a formação dos gametas masculinos tem início com a fase proliferativa (divisões mitóticas), seguido de uma fase meiótica, e finalizar uma fase de diferenciação celular, denominada espermiogênese, resultando na formação do espermatozoide (GRIER, 1981; GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001; SCHULZ, et al. 2010).

A organização do epitélio germinativo no testículo permite a classificação deste órgão em dois tipos: lobular ou tubular anastomosado. O testículo classificado como lobular é caracterizado pela presença de epitélio germinativo organizado em compartimentos que se estendem em prolongamentos que terminam em um fundo cego na periferia do testículo, enquanto que o testículo classificado como tubular anastomosado é caracterizado por um epitélio germinativo organizado em compartimentos interconectados, impedindo a identificação de início ou término do túbulo (GRIER, 1993; PARENTI; GRIER, 2004).

Além disso, o epitélio germinativo pode ser definido como contínuo ou descontínuo (GRIER; TAYLOR, 1998). O epitélio contínuo consiste em um agrupamento contínuo de células germinativas (isoladas ou em espermatocistos) por todo o comprimento de um lóbulo ou túbulo anastomosado, enquanto que o epitélio descontínuo é caracterizado pela ausência dessas células ao longo desses compartimentos; tal fato ocorre devido à abertura dos espermatocistos e a liberação dos espermatozoides para o lúmen; como esta liberação não ocorre de forma uniforme, a parede do lóbulo ou túbulo apresenta alternância entre áreas contínuas e descontínuas, com presença somente de células de Sertoli (GRIER, 1993; GRIER; TAYLOR, 1998; GRIER; LO NOSTRO, 2000, BROWN-PETERSON et al., 2002).

É interessante salientar que a espermatogênese é influenciada por fatores abióticos, estimulando a reprodução, adiando ou até impedindo-a (VAZZOLER, 1996; RIBEIRO; MOREIRA, 2012). Dentre eles destacam-se o pH (concentração de íons de hidrogênio em uma solução), oxigênio dissolvido (OD) e a temperatura (QUEROL; QUEROL; PESSANO, 2004; SILVA; SOUZA; KAYANO, 2007), por serem fatores associados, uma vez que a concentração de oxigênio presente na água e o pH vão variar de acordo com a pressão atmosférica (altitude) e com a temperatura do meio, respectivamente (CETESB, 2015).

Em peixes, fatores exógenos como o fotoperíodo e a temperatura podem funcionar como gatilhos hormonais, de modo que tais hormônios vão atuar em diferentes fases do ciclo gonadal, indicando condições ideais ou não para a desova, por exemplo (MUNRO, 1990 citado por VAZOLLER, 1996).

1.2 A influência da temperatura na reprodução e as mudanças climáticas globais

A temperatura é um dos fatores que governam a existência e interdependência dos organismos e espécies aquáticas, (TUCCI, 2004). As alterações na temperatura de um modo geral causam impactos significativos sobre as espécies, influenciando diretamente nas taxas de sobrevivência, crescimento e no sucesso reprodutivo de uma espécie (PÖRTNER, 2002).

Peixes são organismos ectotérmicos, ou seja, com regulação corporal dependente de fontes externas de calor. Além disso, a maioria tem reprodução externa, de modo que os gametas femininos e masculinos são liberados na água para a reprodução (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001; POUGH; JANES; HEISER, 2008). Assim sendo, qualquer alteração na temperatura (aumento ou diminuição) do meio, poderá causar efeitos no metabolismo e na reprodução desses animais (WOOD; MCDONALD, 1997). É de conhecimento que a temperatura pode influenciar na determinação/diferenciação sexual, alterando sexo de indivíduos e até mesmo causando hermafroditismo (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002) Desta

forma, cada espécie exige uma faixa específica de temperatura na qual suas funções metabólicas possam ocorrer normalmente, sendo denominada de zona de conforto (KUBITZA, 2000).

Neste sentido, vários trabalhos (FRASER et al., 2002; QUINTANA et al., 2004; ALVARENGA; FRANÇA, 2009; DONELSON et al., 2010; MAJHI; CHOUDHARY, 2014; SIQUEIRA-SILVA et al., 2015) demonstram a influência da temperatura no desenvolvimento das espécies aquáticas. Como no estudo feito em machos de robalo flecha, *Centropomus undecimalis*, por Ferraz e Cerqueira (2010), com objetivo de obter machos sexualmente maduros com emprego de duas temperaturas, uma temperatura foi aumentada naturalmente e outra foi elevada gradativamente até 26°C, um dos critérios observados foi o aumento no volume do sêmen ao longo dos meses - e depleção, além de outros fatores que afetam a reprodução de peixes.

De acordo com Nóbrega et al. (2010) a utilização de diferentes temperaturas (20° C, 27° C, 30° C e 35° C) na espermatogênese de zebrafish (*Danio rerio*), mostra que as temperaturas mais altas aceleraram a espermatogênese, entretanto a de 35°C causa anormalidades, como apoptose entre os espermatócitos, ausência de espermatozoides e uma redução do índice gonadossomático.

Resultados similares foram encontrados por Siqueira-Silva et al. (2015) em *Astyanax altiparanae*, de modo que animais expostos a temperatura de 35° C, apresentavam gônadas deplecionadas a partir da quarta semana de exposição a temperatura elevada. Contudo, notou-se que a partir da sétima semana, espermatogônias tronco, indicadas como células de reserva, voltavam a sofrer divisões mitóticas, indicando o início da fase proliferativa da espermatogênese, indicando um possível repovoamento do testículo.

É interessante notar que estudos feitos por Jonsson e Jonsson (2016) demonstram que a ação da temperatura sob a reprodução das espécies pode apresentar efeito trans-geracional,

por meio da ação de mecanismos epigenéticos, aqueles em que há modificações no genoma que podem ser herdadas para as próximas gerações, sem alterações na sequência do DNA. Tais pesquisas comprovaram que a prole de uma segunda geração de *Salmo salar* (Salmão do Atlântico), na qual os pais foram anteriormente expostos a altas temperaturas, produziam ovos maiores do que aqueles animais em que os pais viviam em ambiente com temperatura de conforto estabelecida para a espécie.

Deste modo, fica claro que a temperatura é um fator essencial para a regulação dos processos reprodutivos como a gametogênese, maturação, desova, embriogênese, eclosão e sobrevivência, podendo influenciar de maneira significativa nestes eventos (PANKHURST; PORTER, 2003). Este fato é preocupante no atual cenário mundial, tendo em vista que a mudança climática (aquecimento global) tem sido continuamente debatida em todo meio científico internacional e, conseqüentemente, gerado especulações a respeito das possíveis conseqüências para o planeta (NUNES, 2003; MARENGO, 2006; WALTER, 2007; RUFINO, 2014).

Embora as pesquisas científicas demonstrem a notável relação entre o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera terrestre e a temperatura, ainda há pesquisadores que questionam as mudanças climáticas advindas de resultados da emissão de gases poluentes. Estes cientistas que contestam o aquecimento global defendem a teoria de que a Terra está se aquecendo devido a causas naturais, da mesma forma que mudanças climáticas periódicas ocorreram desde a formação do planeta (WALTER, 2007). Sendo ou não o aquecimento global a causa da elevação das temperaturas, o fato inegável é que: a temperatura média do planeta está em crescente aumento (WALTER, 2007; IPCC, 2014).

De acordo com o terceiro relatório de avaliação do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC, 2014), a temperatura média da atmosfera aumentou em $0,6 \pm 0,2^\circ \text{C}$ durante o século XX. Os modelos globais do IPCC têm mostrado que entre 1900 e

2100 a temperatura global pode aquecer entre 1,4 e 5,8°C, o que representa um aquecimento mais rápido do que aquele detectado no século XX e que, aparentemente, não possui precedentes durante, pelo menos, os últimos 10.000 anos (MARENGO, 2006).

Segundo Cahill et al. (2012) as respostas frente às mudanças é um dos maiores problemas enfrentados pelos cientistas atualmente. Sendo assim, para um melhor entendimento, é preciso estudar as alterações sobre as espécies, sendo essencial para as pesquisas, políticas e gestão da diversidade biológica (COMTE et al., 2013).

Assim, os peixes podem ser considerados bons modelos para pesquisas relacionadas à influência de fatores ambientais sobre a reprodução, pois estão restritos a ambientes aquáticos e a todas as alterações que este meio possibilita, uma vez que a reprodução é um evento fisiológico de custo energético muito alto e somente ocorre quando os animais estão em condições para tal (RIBEIRO; MOREIRA, 2012).

1.3 A espécie modelo

Pertencentes à ordem Characiformes e à família Characidae, animais do gênero *Astyanax* são incluídos numa categoria nomeada *Incertae sedis*. A expressão refere-se ao posicionamento incorreto ou de incerteza para determinar a disposição exata de um táxon dentro da classificação (SANTOS et al., 2004). As espécies do gênero *Astyanax*, conhecidos popularmente como lambaris, são espécies muito conhecidas de *Incertae sedis*, devido ao fato de alguns autores considerarem a falta de evidências que atestem a monofília do grupo, e por isso há incerteza do táxon que estão inseridos (LIMA et al., 2003; BUCKUP et al., 2007)

Assim, *Astyanax altiparanae*, popularmente chamado de lambari-do-rabo-amarelo, é um caracídeo de pequeno porte, distribuído pela bacia do Rio Paraná, Paranapanema, Tibagi e Iguaçu (GARUTTI; BRITSKI, 2000). São peixes onívoros, coletam itens alimentares arrastados pela corrente ou raízes de *Poace* e algas ligadas a rochas e representam significante

parte da dieta dos peixes de maior porte (CASATTI; CASTRO, 1998). São utilizados como iscas na pesca esportiva, como peixes ornamentais e como peixes larvófagos no combate a larvas de pernilongos, além de serem consumidos como petiscos por humanos (SATO et al., 2006).

Além disso, possuem características zootécnicas e reprodutivas interessantes, pois apresentam mais de um período reprodutivo, de modo que reproduzem cerca de três a quatro vezes ao longo do ano, com prole relativamente numerosa, o que faz dessa espécie um excelente modelo experimental para a investigação da biologia reprodutiva de teleósteos (CASTILHO-ALMEIDA, 2007).

Devido às características reprodutivas apontadas, somadas à facilidade de manejo, acondicionamento, aceitação de alimentação artificial e crescimento rápido (PORTO-FORESTI et al., 2005), o lambari-do-rabo-amarelo tem sido muito utilizado como modelo experimental, tanto em estudos básicos relacionados à caracterização das células germinativas desta espécie, como o estudo desenvolvido por Rodrigues et al. (2015), onde determinam a existência de quatro tipos de espermatogônias para *A. altiparanae*, ao desenvolvimento embrionário (PEREIRA et al., 2016), até a estudos mais complexos, como a indução de triploidia (ADAMOV et al., 2016) ou a utilização de altas temperaturas associadas a quimioterápicos (SIQUEIRA-SILVA et al., 2015) para obtenção de animais estéreis para um possível uso em transplante de células germinativas.

1.4 Duração da espermatogênese através de imunodeteção com bromodeoxiuridina

Uma ferramenta importante para avaliar a duração da espermatogênese é a imunodeteção utilizando como marcador a bromodeoxiuridina (5-bromo-2'-deoxiuridina ou BrdU). O BrdU, como é usualmente conhecido, é atualmente um dos reagentes mais utilizados na imunodeteção de células em proliferação. Por ser um nucleotídeo sintético e

análogo ao nucleotídeo timidina, este marcador tem a capacidade de se incorporar no DNA recém-sintetizado durante as divisões celulares, mais propriamente dizendo, a incorporação ocorre durante a fase de síntese (fase S) do ciclo celular. Dessa forma, as células que incorporaram este nucleotídeo sintético podem ser identificadas através de anticorpos anti-BrdU (VAN DE KANT e DE ROOIJ, 1992; SCHULZ et al., 2005; LEAL et al., 2009; OLIVEIRA, 2014).

Desde a década de 1950, o marcador BrdU vem sendo utilizado na identificação de células cancerígenas (HAKALA, 1959; DJORDJEVIC; SZYBALSKI, 1960) e, mais atualmente, no tratamento do câncer, como um possível radiosensibilizador (as células onde ocorre marcação do BrdU tornam-se mais sensíveis aos tratamentos radioterápicos) ou até inibidor de proliferação de células cancerígenas (LEVKOFF, 2008).

Contudo, outros trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando a bromodesoxiuridina na experimentação com peixes, como o estudo desenvolvido por Camargo (2015) onde foi possível identificar células tronco-espermatogoniais de *A. altiparanae* utilizando o tempo de marcação do BrdU ou até a determinação da duração da espermatogênese (fase meiótica e espermatocitária) de algumas espécies realizada por Leal et al. (2009) para *Danio rerio* e Oliveira (2014) para *Cyprinus carpio*.

Neste sentido, a utilização do marcador é relevante para a possível estimativa da duração da espermatogênese e para a avaliação da influência do aumento da temperatura da água sobre a espermatogênese de *Astyanax altiparanae*.

2 OBJETIVO

Frente ao cenário de mudanças climáticas estabelecidas e conseqüentemente as alterações da temperatura global, torna-se essencial estudar os seus efeitos na reprodução dos peixes. Sendo assim, temos:

2.1 Objetivo geral

- Determinação da duração da espermatogênese (fase meiótica e fase espermatocitária) para *Astyanax altiparanae* por meio da exposição testicular ao BrdU, sob temperaturas de 27°C e 32 °C.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os aspectos morfológicos das células germinativas;
- Descrever as fases da Espermatogênese com base nas alterações do epitélio germinativo nas temperaturas testadas;
- Avaliar o índice gonadossomático;
- Avaliar a duração da espermatogênese de animais submetidos à temperatura de 27° C e 32° C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para o cuidado e uso de animais em laboratório da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Ilha Solteira), aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UNESP, protocolo 006/2012/CEUA.

3.1 Animais

Noventa e seis espécimes machos adultos de *Astyanax altiparanae* foram obtidos de criadouros da região de Ilha Solteira. A separação de machos e fêmeas ocorreu no próprio local de compra, de modo que a identificação do sexo foi feita aferindo a presença de espículas na nadadeira anal (MALABARBA, 2005) característica que só ocorre nos indivíduos do sexo masculino sexualmente ativos.

a. Experimentação

Os animais foram separados em dois lotes de quarenta e oito animais, considerando Tratamento 1 aqueles exposto a temperatura de 27° C (T27) e Tratamento 2 a temperatura de 32° C (T32), no período de abril e maio de 2016 e dezembro e janeiro de 2017, respectivamente. Deste modo, a temperatura de 27° C ($\pm 1^\circ$ C), tida como a de conforto para esta espécie no ambiente natural (LADEIRA et al, 2015), e 32° C, escolhida tendo em vista os padrões estimados para o aumento de temperatura neste século segundo o IPCC (2014).

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.NEO) II, na central de laboratórios de Biotecnologia do campus II da UNESP de Ilha Solteira/FEIS. Os animais foram mantidos em sistemas de recirculação (sistemas fechados), divididos em três caixas d'água com capacidade de 500L, em densidade

de dezesseis animais por caixa (para cada temperatura e período de experimentação), totalizando então quarenta e oito animais (n=48) por temperatura testada. Foram alimentados duas vezes ao dia (1% do peso vivo) com ração comercial (Guabi – Pirámirin/1,7mm).

A temperatura dos tanques foi controlada diariamente por meio de aquecedores e refrigeradores, ligados a termostatos já programados para o sistema, sendo aferidas de hora em hora, com o uso de “data loggers”, durante os dois períodos de experimentação, e apresentando variação de cerca de $\pm 0,5^\circ$ C. O fotoperíodo estabelecido foi de 12h. Houve morte de sete animais para a temperatura de 27° C, devido ao comportamento agressivo e territorialista da espécie.

b. Detecção de células em proliferação por incorporação do marcador BrdU

Para a temperatura de conforto, os animais foram colocados no sistema de recirculação de água, e uma semana após a chegada dos mesmos, ocorreu a aplicação do marcador. Já para o tratamento 2, a temperatura do sistema foi ajustada um grau ao dia contando a partir do momento da chegada dos animais. Assim que a temperatura esperada foi alcançada, deu-se continuidade aos procedimentos.

Após esse período, os animais receberam pulsos de injeção intraperitoneal de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) na concentração de 100 mg/Kg de peixe/dia, por dois dias consecutivos (Fig. 1). Estes espécimes foram separados previamente de acordo com o tamanho e massa corporal e receberam doses da solução do marcador (BrdU diluído em tampão fosfato salino pH 7.4 - PBS) correspondentes a estes parâmetros.

As coletas tiveram início assim que o último pulso de injeção foi aplicado, de forma que estabeleceu-se a primeira coleta 26h após a primeira aplicação, seguida de outra após 30h, e por fim coletas realizadas a cada dia, prolongando-se assim por um período de quinze dias.

Sendo assim, foram realizadas dezesseis coletas no período estabelecido, utilizando 3 exemplares para cada uma.

Antes dos procedimentos cirúrgicos, os espécimes foram anestesiados com 0,5 g de benzocaína dissolvida em 5 ml de etanol absoluto e 2 L de água. Os testículos foram removidos, cortados em secções transversais e longitudinais, fixados (por no mínimo) 2h em temperatura ambiente em methacarn (60% metanol absoluto, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) preparado a fresco para cada coleta, em seguida as amostras foram desidratadas em solução em concentrações crescentes de etanol, incorporados em glicolmetacrilato historesina (Technovit 7100), seccionados em cortes de 3.0 µm de espessura utilizando micrótomo (LEICA RM 2145; Leica Instruments GmbH, Nussloch Heidelberg, Alemanha) equipado com lâmina de vidro.

Para a revelação de imunodeteccção, as lâminas foram incubadas em temperatura ambiente durante 1h com anticorpo-BrdU diluído em PBS, contendo 1% de albumina de soro bovino e em seguida durante 1h com Power Vision (polímero Easylink). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Reprodução e Biologia Molecular, no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – IBB.

Os procedimentos e protocolo de marcação nuclear utilizados para esta pesquisa seguiram os métodos estabelecidos por Van De Kant, De Rooji, 1992.

Além da imunodeteccção, foi realizada histologia básica, utilizando coloração de Hematoxilina e Eosina. Todo o material foi analisado através de microscopia de luz (Zeiss - Scope.A1) e fotografado com AxioCam MRC5.

c. Índice Gonadossomático

Foi avaliado o Índice Gonadossomático dos espécimes (IGS), estabelecido por Vazzoler (1981). Tal índice determina a relação da massa gonadal em relação à massa corporal do indivíduo. Tal relação é expressa em porcentagem, dada pela seguinte fórmula: $IGS = (\text{massa das gônadas}/\text{massa corpórea}) \times 100$. O IGS dos animais nas duas temperaturas foram comparados e submetidos a análises estatísticas.

d. Análise Estereológica

Para a realização da análise estereológica, nas duas temperaturas testadas, foram analisados animais coletados a 26h, 30h, 6 dias, 10 dias e 13 dias após a primeira exposição ao marcador, referindo-se então à 1^a, 2^a, 7^a, 11^a e 14^a coletas, respectivamente, sendo 3 animais por coleta.

A análise estereológica foi realizada utilizando uma grade de intersecção de 420 pontos (Motic Image Plus 2.0), sobreposto a uma área da secção histológica obtida a partir da região central do testículo dos animais estudados. Considerou-se que cada grade é equivalente a um campo, dessa forma cinco campos (2.100 pontos) foram contados aleatoriamente para cada animal analisado, sob microscopia de luz com magnificação de imagem de 400x. Deste modo, totalizando então 63.000 pontos analisados.

Assim, foram analisadas as quantidades dos seguintes tipos celulares marcados: espermatogônias A-indiferenciadas, espermatogônias diferenciadas, espermatogônias B, espermatócitos, espermátides, espermatozoides, células picnóticas e células de Sertoli.

e. Análise Estatística

Para a realização da análise estatística relacionada à estereologia deste trabalho, utilizou-se o software livre BioEstat (Instituto Mamirauá). Inicialmente aplicou-se teste de

homogeneidade de Bartlett e teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificação das premissas necessárias para testes paramétricos. Assim que notou-se que os dados atendiam a tais premissas, foram conduzidas análises com Teste-T (comparação de pares) . Os dados que não atenderam as premissas necessárias para testes paramétricos foram analisados utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney (Teste U). Todos os dados foram expressos pela média e desvio padrão.

4 RESULTADOS

Os testículos de *Astyanax altiparanae* são órgãos pares e alongados, dispostos na porção dorsal da cavidade abdominal dos animais, de forma que ficam posicionados ventralmente ao sistema néfrico e à bexiga natatória (Fig. 2A). Prolongam-se no sentido crâniocaudal e fundem-se na porção posterior formando o ducto que se estende até a abertura da papila urogenital (Fig. 2A), por onde os espermatozoides serão liberados para o meio externo durante a espermiacção.

Macroscopicamente os testículos não apresentam coloração quando os animais estão imaturos, de modo que os órgãos apresentam certa transparência. À medida que o animal entra no ciclo reprodutivo e desenvolvem os testículos, passam a apresentar coloração branca leitosa, tornam-se delgados e mais volumosos (Fig. 2B).

4.1 Histologia

Espermatogênese

A espermatogênese em *A. altiparanae* foi definida de acordo com a morfologia do epitélio germinativo e as características celulares encontradas. Assim, foi possível subdividir a espermatogênese em fase mitótica, fase meiótica e espermiogênese.

A fase mitótica, o momento em que ocorre intensa proliferação celular, abrange as maiores células da linhagem germinativa de *A. altiparanae*, as espermatogônias A – indiferenciadas* (Aind*) (Fig. 3A). São células encontradas sempre isoladas, possuem basofilia moderada, possuem núcleo irregular, sendo possível identificar mais de um nucléolo por célula. Por meio de divisões mitóticas, espermatogônias Aind* dão origem a espermatogônias A-indiferenciadas (Aind) (Fig. 3B), de modo que estas células permanecem

isoladas e dispersas pelo epitélio, entretanto há um aumento na basofilia de células Aind, são células com formato circular, e geralmente encontradas com apenas um nucléolo.

Seguindo a linha de divisões mitóticas, células Aind originam espermatogônias A-diferenciadas (Adif) (Fig. 3C), que agora já são observadas em grupos de duas, quatro ou mais células, já formando espermatocistos. O núcleo possui forma circular, com basofilia reduzida, em relação às células anteriores, entretanto possuem nucléolo volumoso e bem evidenciado. Por fim, células Adif originam espermatogônias B, finalizando o que pode ser chamado de fase mitótica. Espermatogônias B (Fig. 3D) são células menores em relação à linhagem anterior, forma novamente ovalada e nucléolos bastante evidenciados, sendo encontrados quatro ou mais nucléolos por célula. São sempre encontradas em cistos de seis células ou mais.

A fase meiótica tem início assim que espermatogônias B entram em meiose originando espermatócitos primários (Fig. 4A, B e C). Desse modo, tal fase também pode ser chamada de fase espermatocitária. É possível encontrar espermatócitos em diferentes fases da meiose, e assim como as células descritas acima, também podem ser distinguidas devido às características nucleares.

Cistos de espermatócitos em leptóteno e zigóteno (Fig. 4A) apresentam núcleo volumoso e são maiores que as espermatogônias B, entretanto possuem coloração homogênea e relativamente clara em relação ao tipo celular anterior. Espermatócitos em paquíteno (Fig. 4B) possuem núcleo mais condensado em relação a espermatócitos em leptóteno e zigóteno, devido ao momento da divisão celular em que se encontram, pois está ocorrendo o pareamento dos cromossomos para efetivação do crossing-over.

Espermatócitos em diplóteno apresentam basofilia intensa devido à condensação dos cromossomos, apresentam núcleos heterocromáticos, de forma que possuem aparência de

material craquelado. Geralmente, cistos de espermatócitos em diplóteno são sempre encontrados com figuras metafásicas (metáfase I) (Fig. 4C).

Assim que a primeira fase da divisão meiótica é encerrada, encontram-se cistos de espermatócitos secundários (Fig. 4D), contudo, neste estágio celular não é possível identificar novamente os eventos da meiose devido à rapidez com que essa segunda divisão ocorre.

Seguindo as fases da espermatogênese de *A. altiparanae*, temos então a espermiogênese (Fig. 5). Neste momento, espermatócitos secundários diferenciam-se em espermatídes iniciais (Fig. 5A), intermediárias (Fig. 5B) e finais (Fig. 5C), que podem ser assim classificadas devido à aparência, compactação nuclear e espaçamento entre elas, dentro de um mesmo cisto. Espermatídes iniciais são relativamente menores quando comparadas a todas as outras células já descritas, apresentam núcleo bastante condensado e redondo. Estas diferenciam-se em espermatídes intermediárias e finais, tendo espaçamento entre as células aumentado de acordo com o estágio em que se encontram. Tal espaçamento entre as células deve-se à formação do flagelo e eliminação do citoplasma residual.

No final do processo de espermiogênese, os cistos são desfeitos e os espermatozoides são liberados no lúmen (Fig. 5D), possuem núcleo ligeiramente menor que as células anteriores. Assim, espermatozoides são as menores células da linhagem germinativa de *A. altiparanae* e também as células que finalizam o processo de espermatogênese.

Ciclo Testicular

Foram definidas cinco fases para o desenvolvimento testicular de *Astyanax altiparanae*. Para isto, foi utilizado o padrão estabelecido por Grier (2002) e adaptado para esta espécie.

- Regredido: somente espermatogônias estão presentes no epitélio germinativo, sendo espermatogônias Aind*, Aind, Adif e espermatogônias B. É possível notar que há intensa

proliferação das células citadas. O testículo está se reestruturando para entrar novamente em maturação, iniciando novamente um ciclo reprodutivo, assim é possível encontrar espermatozoides residuais de outros ciclos (Fig. 6A e B).

- Maturação inicial: há a presença de espermatogônias e neste momento já são encontrados inúmeros cistos de espermatócitos em leptóteno, zigóteno e diplóteno. Há também cistos de espermátides e alguns espermatozoides no lúmen. Nota-se que esta fase é caracterizada pela presença de todos os tipos celulares e um epitélio germinativo completamente contínuo, de forma que os túbulos são facilmente identificados (Fig. 6C e D).

- Maturação intermediária: À medida que esta fase avança a descontinuidade torna-se cada vez mais evidente. Assim como na fase anterior, há a presença de todos os tipos celulares, com um notável aumento de cistos de espermatócitos e espermátides. Além disso, a presença de espermatozoides no lúmen é bem maior que na fase anterior (Fig. 6E e F).

- Maturação final: o epitélio germinativo encontra-se descontínuo. Agora, o lúmen está repleto de espermatozoides prontos para serem liberados. Há a presença de poucos cistos pelo epitélio, com dispersas espermatogônias Aind* e Aind, uma vez que tais células servem de reserva para o próximo ciclo (Fig. 7A e B).

- Regressão: neste momento o testículo apresenta aspecto delgado, devido à liberação dos gametas para o meio (Fig. 7A). Há a presença de muitas células com núcleo picnótico (Fig. 7B) e tecido sendo reabsorvido (Fig.7C). O epitélio completamente descontínuo, com cistos e espermatogônias dispersos, entretanto, podem ser encontrados espermatozoides residuais em pequenas quantidades.

4.2 Análise do Índice Gonadossomático (IGS)

Analisando o IGS dos animais (Fig.8) nas duas temperaturas analisadas, nota-se que por mais que as coletas tenham sido realizadas em períodos diferentes do ano (abril/maio

2016 e dezembro/janeiro 2017), há, para as duas temperaturas, animais em diferentes fases do ciclo testicular (Fig. 9), indo desde animais regredidos ou em regressão (IGS entre 0,1 a 0,8) até animais em maturação final (IGS entre 2,5 e 5). Entretanto, é possível observar que o IGS dos espécimes com a temperatura elevada manteve-se sempre mais alto comparado aos animais em temperatura de conforto.

4.3 Determinação da duração da espermatogênese (fase meiótica à fase espermiogênica)

Temperatura de 27° C

Por meio do protocolo de aplicação do marcador BrdU sob temperatura da água a 27°C, foi possível estimar a duração da espermatogênese para *A. altiparanae*, sendo possível diferenciar células marcadas e não marcadas, devido à coloração acobreada que a célula marcada passa a apresentar. A avaliação deu-se a partir do tipo de célula germinativa mais avançada que incorporou BrdU desde a primeira coleta analisada.

Sendo assim, observou-se que 26h após a primeira exposição do testículo de *A. altiparanae* ao marcador, foram encontradas células de Sertoli, espermatogônias Aind*, Aind, Adif e espermatogônias do tipo B marcadas (Fig. 10). Além disso, as células germinativas encontradas em estágio mais avançado e que retiveram o marcador foram espermatócitos em paquíteno, sendo então o ponto de partida determinado para a contagem da duração estimada da espermatogênese.

A partir deste período até 72 horas, ou seja, até o terceiro dia (Fig. 11D), as células mais avançadas que retinham o marcador molecular ainda eram células em paquíteno; o testículo, de modo geral, apresentava as mesmas condições citadas ao primeiro tempo. Entretanto, no quarto e quinto dias (96 e 120h) já foram encontrados cistos de espermátides iniciais retendo BrdU (Fig. 11E e F).

No sexto dia (144h), já foi possível observar espermatozoides marcados no lúmen, indicando o tempo de duração do processo espermatogênico (Fig. 11G). No sétimo e oitavo dias de exposição ao marcador (168 e 192h), a intensidade de espermatozoides na luz aumentou consideravelmente, demonstrando o contínuo desenvolvimento da espermatogênese (Fig. 11H e I).

Em relação à segunda semana após o segundo pulso de BrdU, células germinativas marcadas são cada vez mais escassas quando comparadas com a primeira semana.

Temperatura de 32° C

Os espécimes submetidos à temperatura da água de 32° C foram analisados seguindo os mesmos procedimentos dos espécimes que estavam em temperatura de conforto. Assim, na primeira coleta realizada, sendo 26h após a primeira exposição ao marcador BrdU, foram encontrados diversos tipos celulares marcados no testículo. Sendo elas, as células de Sertoli, espermatogônias Aind*, Aind, Adif e espermatogônias do tipo B, espermatócitos, espermátides e, surpreendentemente, espermatozoides (Fig. 12).

Tal resultado demonstra que a duração da espermatogênese, a partir da fase meiótica até a espermiogênica, foi reduzida a aproximadamente um dia (Fig. 12D e E) para animais em temperatura elevada (5° C acima da temperatura de conforto para esta espécie).

4.4 Análise Estereológica

A análise estereológica foi realizada comparando o total de células contabilizadas para cada tipo celular estipulado, e comparado par a par entre os tratamentos testados. Entende-se por Aind, a somatória dos tipos espermatogônias Aind* e Aind, devido à dificuldade de identificação desses tipos, com a incorporação do marcador BrdU. Sendo assim, em relação às

espermatogônias Aind, Adif e espermatogônias B, espermatócitos e células de Sertoli, não apresentaram diferenças estatísticas entre as temperaturas. Entretanto, nota-se que há um aumento relevante na quantidade dessas células para os animais expostos à temperatura de 32°C (Fig. 13).

Por outro lado, foram encontradas diferenças significativas na quantidade de espermatídes, espermatozoides e células picnóticas (Fig. 13). Tal resultado sugere o aumento na proliferação celular, devido ao aumento de temperatura, mas também observa-se um aumento na morte celular devido a alta temperatura, apesar de ambos os valores serem baixos.

5 DISCUSSÃO

A análise histológica e posterior descrição das células germinativas de *Astyanax altiparanae* são fundamentais para o entendimento da biologia reprodutiva da espécie, tendo em vista que a gametogênese é parte inicial de todo o evento reprodutivo. Além disso, esta espécie vem ganhando destaque, devido seu grande potencial comercial na aquicultura (SABBAG, 2011), o que torna essencial o conhecimento da biologia reprodutiva para alavancar a sua produção em cativeiro.

Neste sentido, a identificação dos quatro tipos espermatogoniais descritos para *A. altiparanae*, neste trabalho e em Rodrigues et al. (2015), tornava-se essencial para a melhor compreensão da fase mitótica e o seu reconhecimento nas análises com o marcador molecular. Entretanto, observa-se que há variação nos tipos espermatogoniais, não só entre as espécies em si, mas principalmente pelas técnicas adotadas ao longo dos anos (GRIER, 1981; MOJICA, 2007; LEAL et al. 2009; RUPIK; HUSZNO; KLAG, 2011).

Inicialmente, espermatogônias eram descritas como primárias e secundárias (GRIER, 1981), o uso desses termos para classificação destas células perdurou por muito tempo, mesmo com técnicas mais avançadas para possível diferenciação destas células, como no caso de três espécies de Characiformes, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Hyphessobrycon bifasciatus* e *Hyphessobrycon eques* (MOJICA, 2007).

Em estudos recentes, Leal et al. (2009) conseguiram identificar cinco tipos de espermatogônias para *Danio rerio*, peixe tropical de água doce da ordem Cypriniformes, sendo espermatogônias indiferenciadas* (Aind*), espermatogônias indiferenciadas (Aind), espermatogônias diferenciadas (Adif), espermatogônias B iniciais e finais. Por mais que a espermatogênese siga um padrão conservativo entre as espécies, nota-se que há ainda certa confusão quanto à terminologia utilizada para identificação e descrição espermatogonial, o que pode ser explicado devido à complexidade deste processo (DE ROOIJ; RUSSELL, 2000)

e devido a dúvidas que ainda existem em relação à fase inicial de proliferação mitótica entre espermatogônias Aind* e Aind (LEAL et al., 2009, SCHULZ, 2010). Leal et al. (2009) utilizaram técnicas de microscopia de luz de ultra-resolução para a caracterização e descrição morfológica espermatogonial em *Danio rerio*, fator que pode ter contribuído para a possível diferenciação em cinco gerações espermatogoniais, enquanto que neste trabalho conseguimos descrever apenas quatro.

Com o início da fase espermatocitária (meiótica), cistos de espermatócitos em *A. altiparanae* puderam ser identificados de acordo com o modo em que o núcleo celular encontrava-se, pois nesse momento ocorre a primeira divisão meiótica (espermatócitos I). Mesmo que não tenham sido utilizadas técnicas de microscopia eletrônica, tal nível de detalhamento pode ser nitidamente observado em microscopia de luz, pois é possível observar as mudanças ocorridas nos núcleos celulares devido à condensação e arranjo dos cromossomos (LEAL et al., 2009; URIBE; GRIER; MEJÍA-ROA, 2015).

Indicando a finalização das divisões meióticas, cistos de espermatídes foram identificados e classificados em iniciais, intermediários e finais, para *A. altiparanae*. Costa et al. (2014) classificaram a espermatogênese de *A. altiparanae* como semicística, sugerindo que espermatídes podem ser liberadas no lúmen e assim, células livres de cistos acabam de diferenciar-se em espermatozoides na luz. Entretanto, tal fato não foi observado neste estudo, tendo em vista que espermatídes foram encontradas apenas em espermatocistos.

Apoiadas em uma membrana basal, células de Sertoli circundam as células germinativas por meio de projeções citoplasmáticas, de modo a formar os cistos com tais células em seu interior (GRIER, 1981; GRIER, 1992; SCHULZ et al., 2010). Dessa forma, células de Sertoli são responsáveis pelo suporte mecânico, nutricional e hormonal das células do interior dos cistos, além de fagocitarem os corpos residuais (células apoptóticas e até

citoplasma eliminado durante a espermiogênese) resultantes da espermatogênese (BILLARD, 1970; SCHULZ; NÓBREGA, 2011, URIBE; GRIER; MEJÍA-ROA, 2015).

Por meio da descrição morfológica das células envolvidas na espermatogênese, tornou-se possível classificar as fases testiculares encontradas em *A. altiparanae*. Para tanto, foi usado o modelo proposto por Grier (2002), e adaptado para esta espécie. Outro modelo de terminologia para classificação do desenvolvimento reprodutivo em peixes foi estabelecido por Brown-Peterson et al. (2011), inicialmente proposto para Perciformes marinhos, tal terminologia vem sendo frequentemente adaptada para teleósteos de um modo geral (QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER; ISHIBA, 2013; DOS SANTOS-SILVA, 2014).

Entretanto, para realização deste trabalho, optou-se pela utilização da classificação anterior, visto que as classificações de Brown-Peterson et al. (2011) aplica-se naturalmente para fêmeas, enquanto que para machos deixa dúvidas em relação aos animais classificados em desenvolvimento e considerados aptos á desova, visto que algumas características das duas fases se sobrepõe, causando dificuldade em identificar e separar as mesmas.

Animais do gênero *Astyanax* costumam ter mais de um pico de reprodução ao longo do ano, de modo que a qualquer momento, podem ser encontrados espécimes em diferentes fases do ciclo gonadal (BARBIERI, G.; DOS SANTOS, M. V.; DOS SANTOS, J. M., 1982); este comportamento reprodutivo não é exclusivo de lambaris, pois também pode ser visto no peixe ornamental *Laetacara araguaiae* (DOS SANTOS-SILVA, et al.; 2015). Tal fato corrobora com os dados de IGS apresentados neste trabalho, onde se observa que por mais que as coletas tenham sido realizadas em períodos diferentes do ano, nos dois tratamentos foram encontrados animais desde regredidos até em maturação final, sendo aptos a reprodução.

Assim como a descrição das células germinativas e a classificação das fases do ciclo testicular, a duração da espermatogênese pode ser um mecanismo interessante para a

utilização na conservação de espécies, em pisciculturas e recursos pesqueiros de um modo geral. Através da técnica estabelecida para marcação celular utilizando a bromodeoxiuridina, foi possível estimar a duração da espermatogênese (fases meiótica à espermiogênica) de *A. altiparanae*, sob temperatura de conforto indicada para a espécie, em aproximadamente seis dias.

Equivalente ao que ocorre em *Danio rerio* (LEAL et al., 2009) o qual também teve a espermatogênese com duração estimada em cerca de seis dias, este tempo foi considerado pelos autores como um período curto para a duração das fases meiótica e espermiogênica. Similarmente à metodologia realizada por Leal et al. (2009) e para este trabalho, Oliveira (2014), estimou a duração da espermatogênese para *Cyprinus carpio* em cerca de uma semana em animais mantidos a 28°C, resultados que também foram obtidos por Vigoya (2016) para animais mantidos em 26°C. Os distintos resultados obtidos nestes estudos enfatizam que apesar da gametogênese apresentar um padrão conservativo entre as espécies, tal evento tem particularidades que podem ser consideradas espécie-específicas.

Contudo, analisando os animais expostos a temperatura elevada (32°C), nota-se a drástica redução no tempo para formação dos gametas de *A. altiparanae*, na qual o período de duração da fase meiótica até o fim da fase espermiogênica foi estimado em um dia. Seguindo os protocolos já estabelecidos para esta técnica de marcação, não realizamos coletas logo após o primeiro pulso de aplicação, assim não podemos afirmar em quantidades de horas exatas que esse evento ocorre, devido as primeiras coletas serem realizadas apenas 26h após a primeira aplicação.

Trabalhos científicos relacionando variação de temperatura e espermatogênese vem sendo desenvolvidos há um longo tempo (BRETON, BILLARD, 1977; FRAILE et al. 1994). Vários efeitos vêm sendo relatados em relação às consequências na reprodução de peixes devido a esta alteração no meio. De modo que alguns são nocivos, como observado em

Astyanax altiparanae por Siqueira-Silva et al. (2015), onde a espermatogênese foi deplecionada em animais expostos a temperaturas ao redor de 35°C. Ou até mesmo os resultados obtidos por Donelson et al. (2010) para *Acanthochromis polyacanthus*, onde tais espécimes submetidos a temperatura de 31,5°C apresentavam fêmeas com oócitos com área inferior àsquelas em temperatura ambiente, machos com menor produção de sêmen e por fim, também tiveram taxa de crescimento restrita.

Por outro lado, alguns resultados podem parecer satisfatórios, como os resultados alcançados com *Lepidocephalus guntea*, um Cypriniforme distribuído por todo Nepal, Tailândia e norte da Índia, onde animais expostos à temperatura de 30 e 35°C tiveram intensa proliferação celular, estimulando a reprodução, diferente do que ocorreu em animais em temperatura de conforto para aquela espécie (20°C) (MAJHI; CHOUDHARY, 2014). Resultados similares ao ocorrido neste estudo, onde se observa, devido a utilização do marcador, que houve maior proliferação celular nos animais submetidos ao tratamento 2, influenciando até mesmo no IGS elevado para estes espécimes.

Breton e Billard (1977) relataram que temperaturas baixas da água estimulam proliferação de espermatogônias, enquanto que temperaturas mais altas estimulam proliferação de cistos de espermatídes e espermatozoides em *Salmo gairdneri*. Resultados semelhantes foram encontrados em *Oreochromis niloticus* por Melo et al.(2016), onde notou-se que baixas temperaturas influenciavam na proliferação de espermatogônias e na renovação celular. Outro ponto de grande interesse é que o aumento da temperatura da água também influencia no desenvolvimento embrionário, acelerando-o.

Embriões de *Pimelodus maculatus* incubados em temperaturas distintas apresentam tempos de desenvolvimento diferentes, de modo que a 25°C tiveram tempo de desenvolvimento estimado em 17 horas, enquanto que embriões em 29°C tiveram tempo reduzido para 13 horas (BUZOLLO et al., 2011). Metodologias utilizadas para

criopreservação de embrião das espécies, também demonstram que congelamentos, ou vitrificações (redução brusca da temperatura, sendo o material biológico mergulhado em nitrogênio líquido) também causam deformidades nos embriões, e conseqüentemente morte do material criopreservado (COSTA, 2017).

Alterações na temperatura da água irão refletir diretamente nos processos reprodutivos, como a espermatogênese, embriologia e período reprodutivo, de um modo geral (FRASER et al., 2001; ALVARENGA; FRANÇA, 2009; SIQUEIRA-SILVA, 2015). Contudo, é importante lembrar que alterando-se a temperatura da água, outros fatores no meio serão alterados, como pH, pois quando há um aumento na temperatura, o pH diminui; da mesma forma, uma diminuição na temperatura implica em um aumento no pH. Conseqüentemente, alterações no pH irão refletir nos níveis de íons amônio na água (PEDROZO; KAPUSTA, 2010).

Outro fator limitante para a vida na água é o oxigênio dissolvido, pois sabe-se que temperaturas mais baixas têm maior capacidade de dissolver oxigênio, enquanto que o contrário também ocorre, temperaturas mais elevadas dissolvem oxigênio com menos eficiência (CETESB, 2015). Assim, devem-se relacionar os efeitos causados na reprodução de peixes vindo das mudanças de temperatura na água como um todo, visto que todo o meio aquático é modificado.

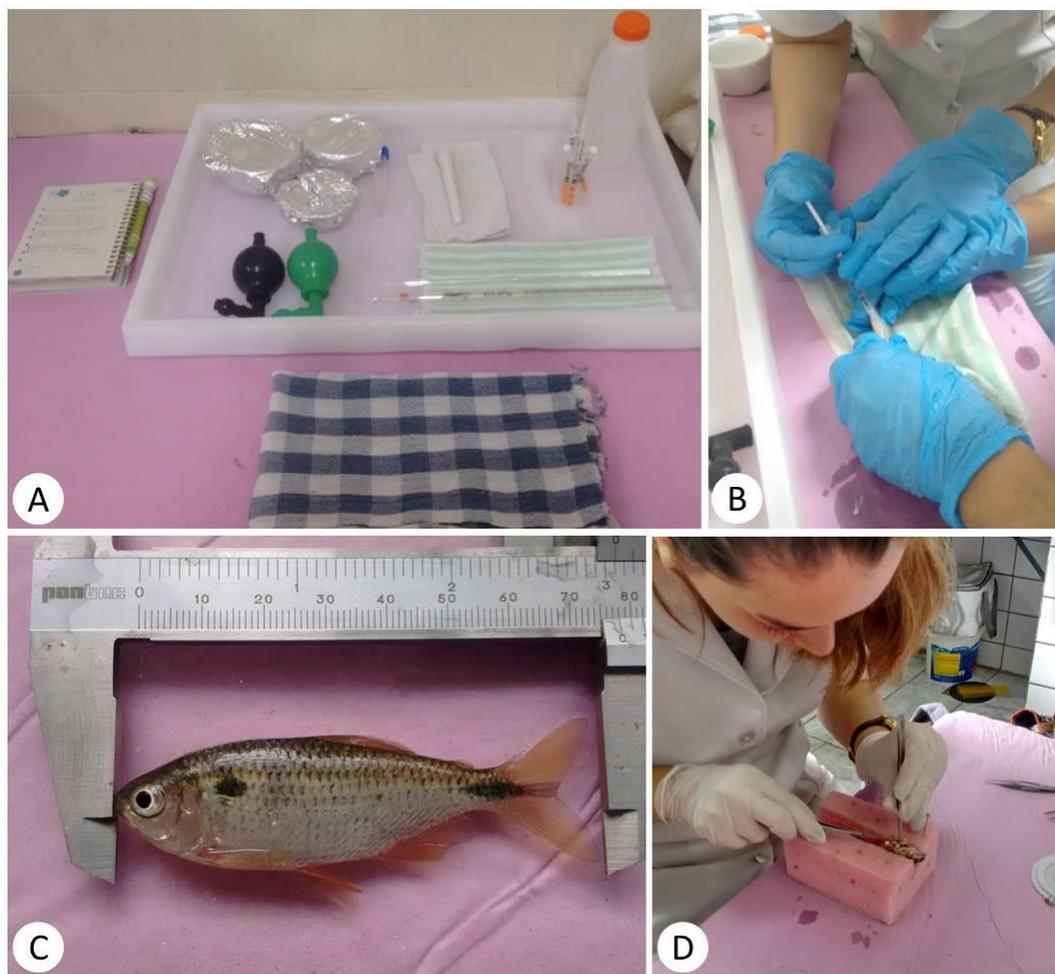
6 CONCLUSÃO

Com base nas diferenças morfológicas das células germinativas presente no testículo de *Astyanax altiparanae*, foi possível a identificação de espermatogônias do tipo A-indiferenciadas*, A-indiferenciadas, A-diferenciadas e espermatogônias do tipo B. As fases para o ciclo reprodutivo foram classificadas de acordo com as características do epitélio germinativo, sendo Regredido, Maturação Inicial, Maturação Intermediária, Maturação Final e Regressão.

Com relação à elevação da temperatura da água, podemos concluir que ela acelera o processo espermatogênico (fase meiótica e espermiogênica) em *A. altiparanae*, proporcionando um aumento na proliferação de espermátides e espermatozoides e um discreto aumento na morte celular. Deste modo, houve uma redução de cinco dias quando a mesma é alterada de 27°C para 32°C, de forma que a espermatogênese em *A. altiparanae* submetidos à temperatura da água a 27°C tem duração mínima de seis dias e à 32°C tem duração mínima de um dia.

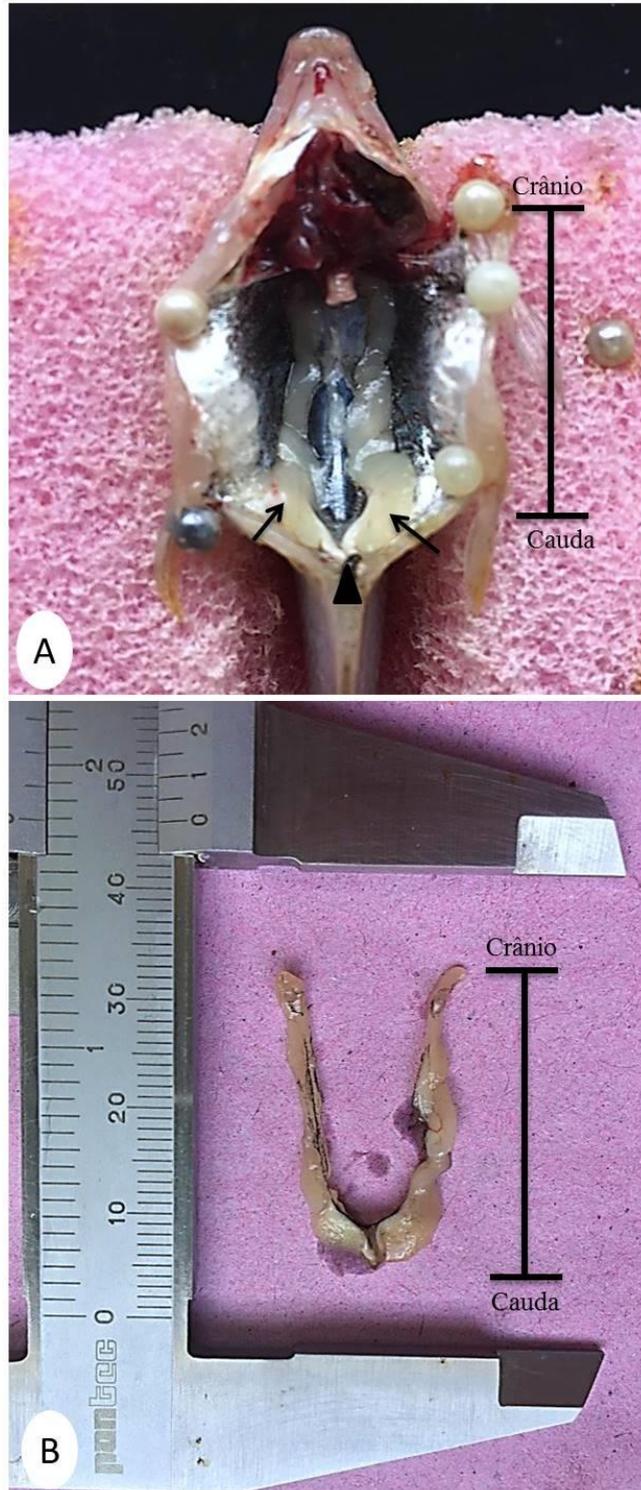
7 LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aplicação de BrdU em exemplares de *Astyanax altiparanae*. A e B: Material utilizado e aplicação de BrdU. C: Biometria dos exemplares. D: Coleta dos testículos.



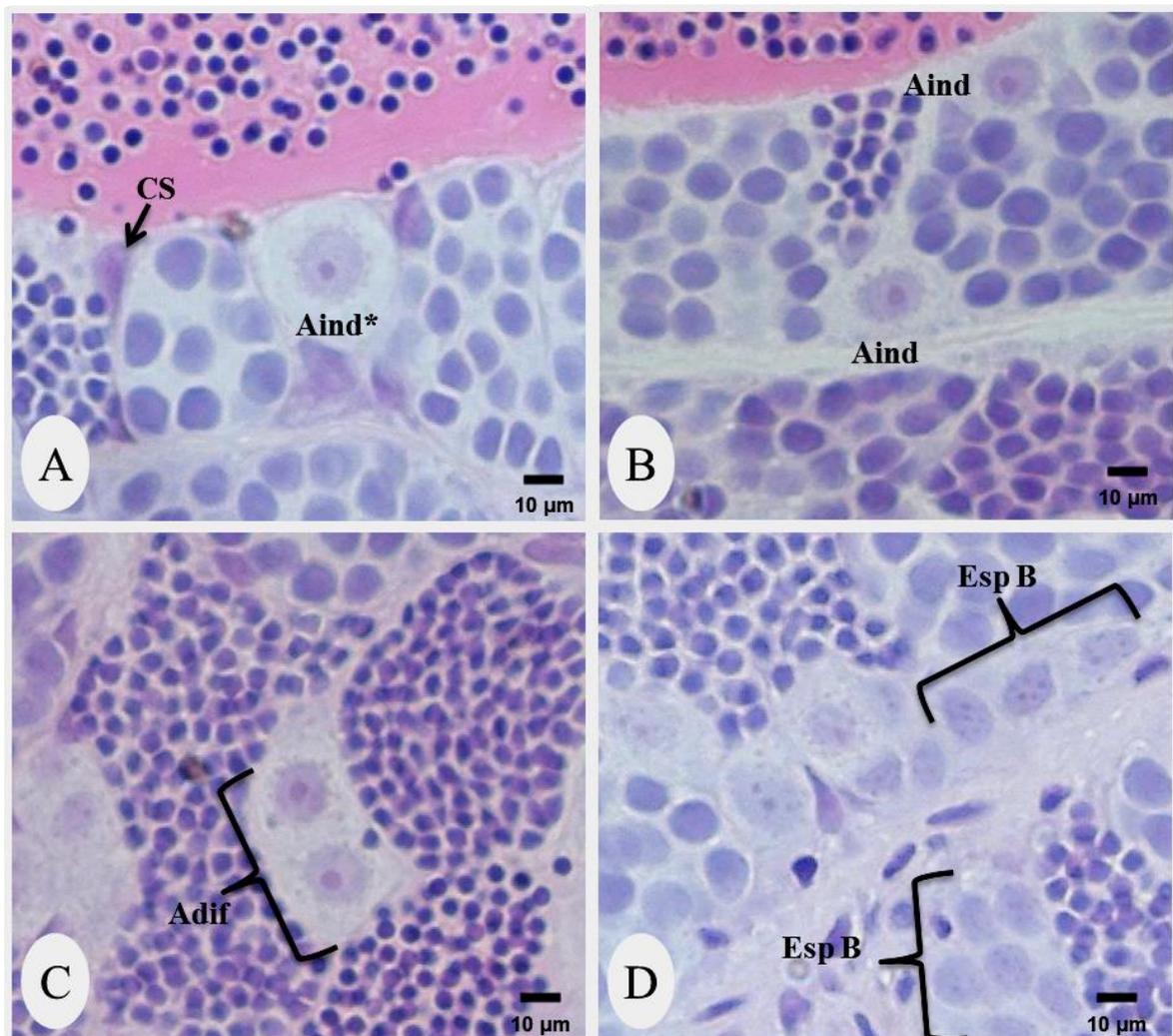
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 2: Disposição dos testículos de *Astyanax altiparanae*. A: Posição das gônadas na cavidade abdominal. B: Testículos removidos. Cabeça de seta: papila urogenital. Setas: Testículos.



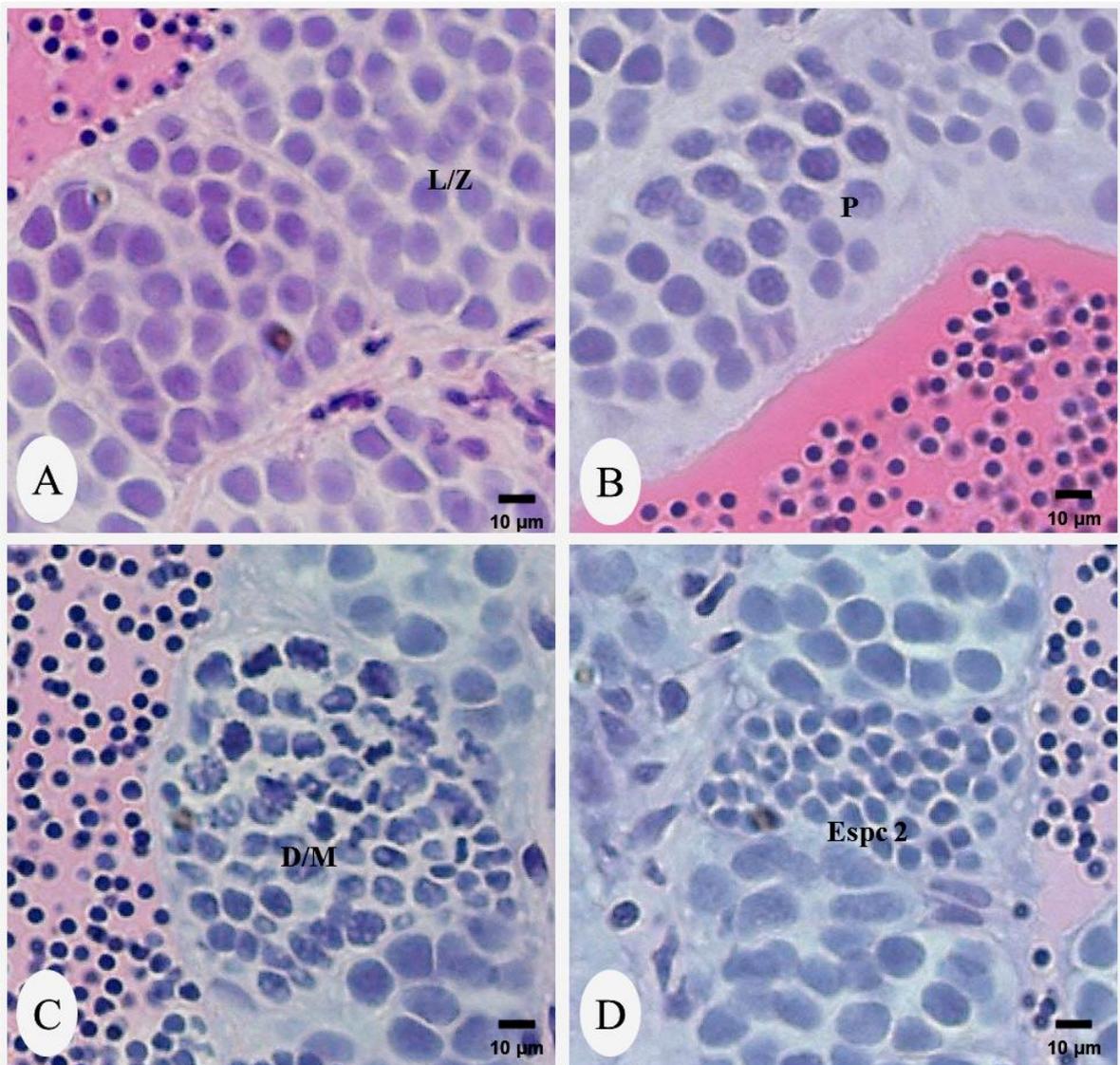
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 3: Tipos espermatogoniais em *Astyanax altiparanae*. A: Espermatogônias indiferenciadas * (Aind*). B: Espermatogônias indiferenciadas (Aind). C: Espermatogônias diferenciadas (Adif). D: Cistos de espermatogônias do tipo B (Esp B). CS: Células de Sertoli. Coloração: Hematoxilina/Eosina.



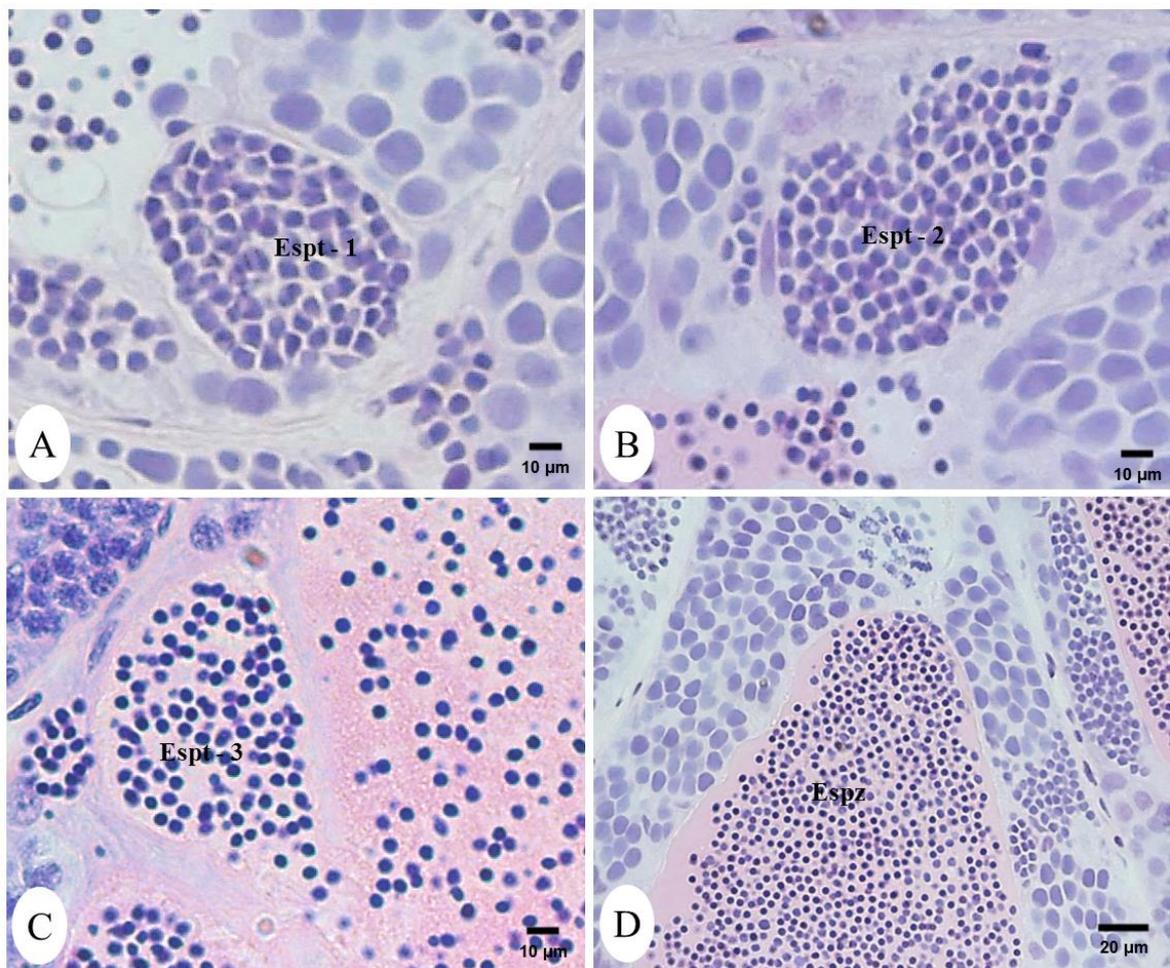
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 4: Fase meiótica ou espermatocitária em *Astyanax altiparanae*. A: Cistos de espermatócitos em leptóteno/zigóteno (L/Z). B: Cisto de espermatócitos em paquíteno (P). C: Cisto de espermatócito diplóteno (D) e metáfase I (M). D: Cisto de espermatócitos secundários (Espc 2). Coloração: Hematoxilina/Eosina.



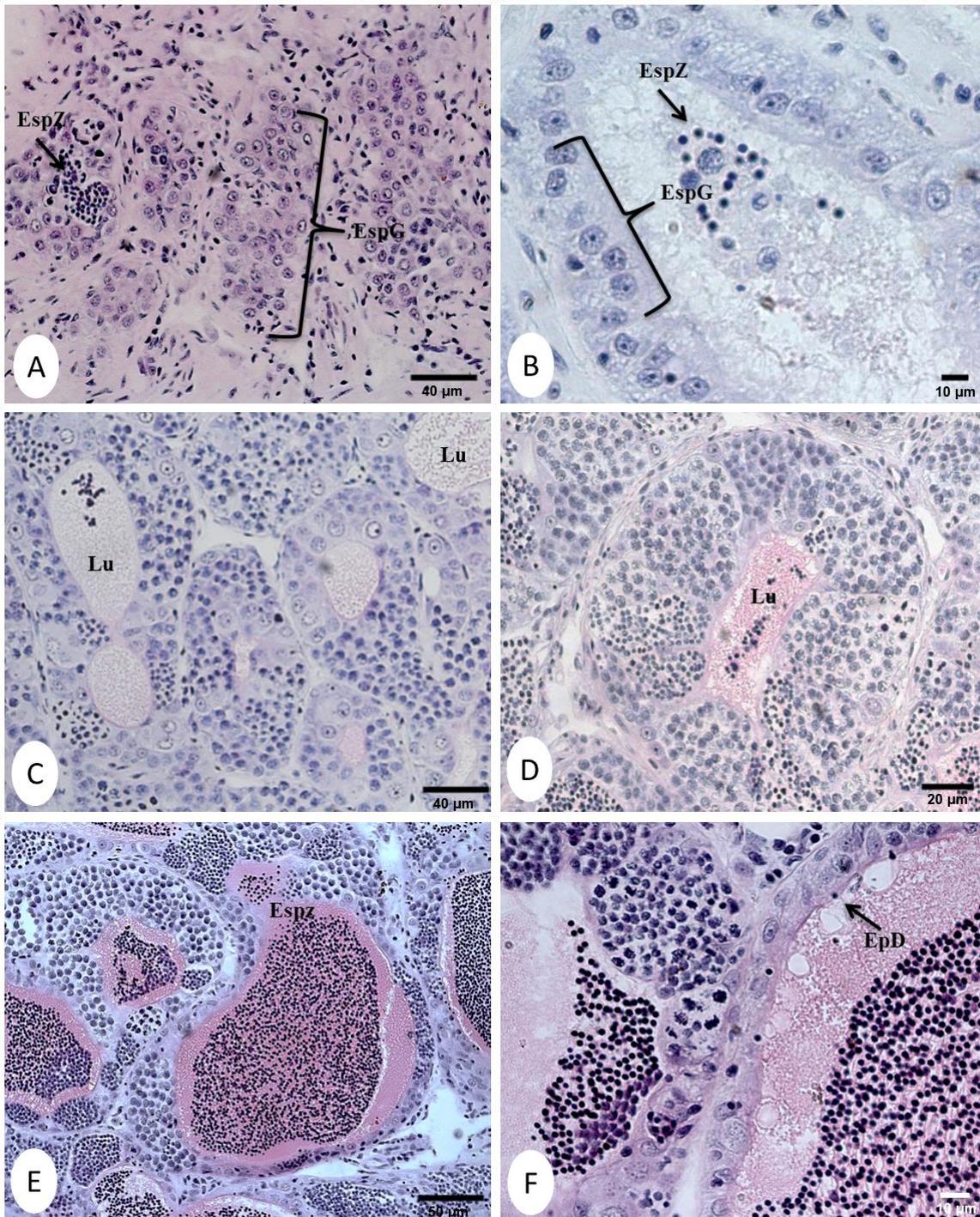
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 5: Espermiogênese em *Astyanax altiparanae*. A: Cisto de espermatídeos iniciais (Espt-1). B: Cisto de espermatídeos intermediários (Espt-2). C: Cisto de espermatídeos finais (Espt-3). D: Espermatozoides (Espz) no lúmen (Lu) dos túbulos seminíferos. Coloração: Hematoxilina/Eosina.



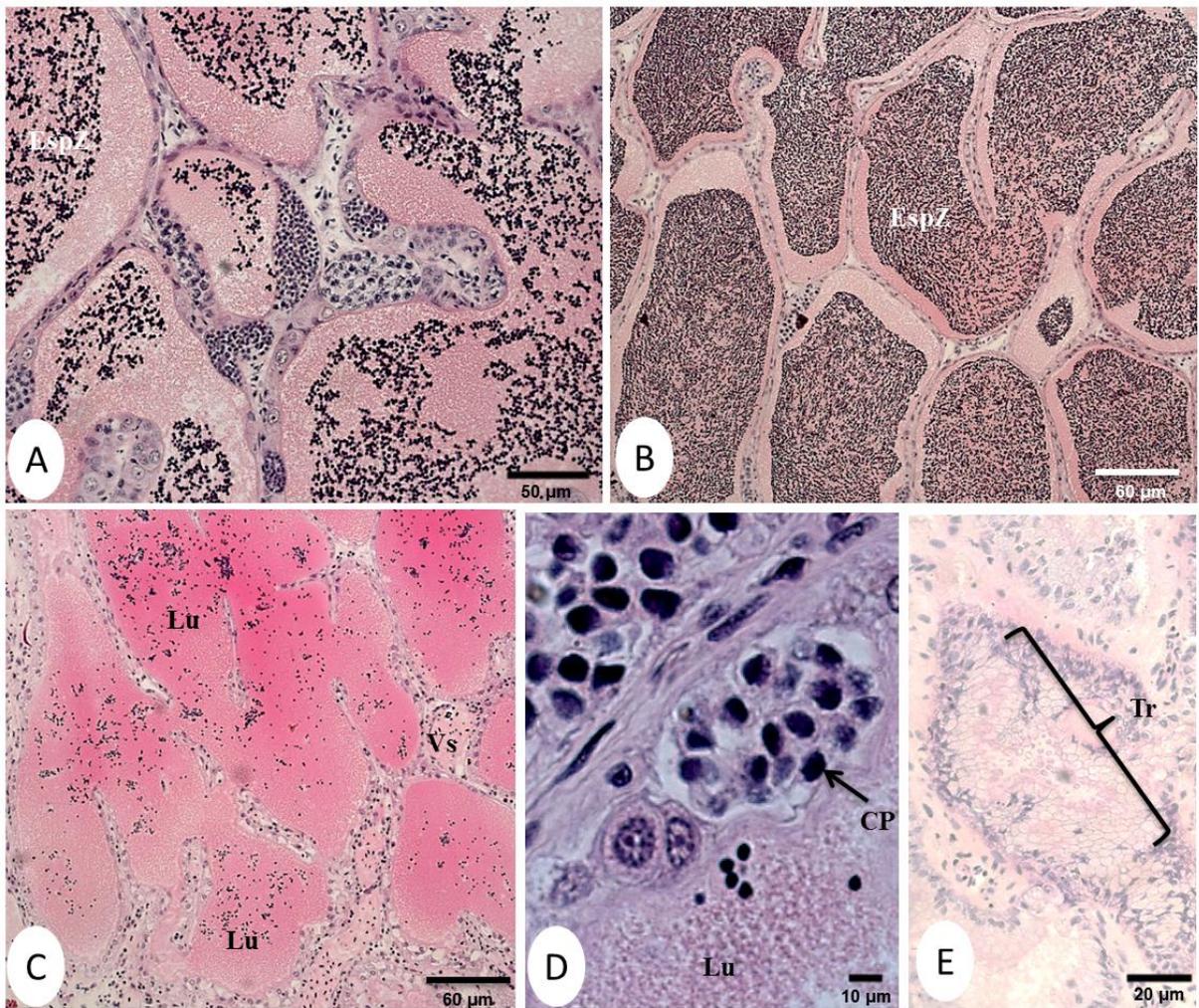
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 6: Fases do desenvolvimento testicular de *Astyanax altiparanae*. A e B: Regredido. C e D: Maturação inicial. E e F: Maturação intermediária. EspZ: espermatozoides. EspG: espermatogônias. Lu: Lúmen. EpD: epitélio descontínuo. Coloração: Hematoxilina/Eosina.



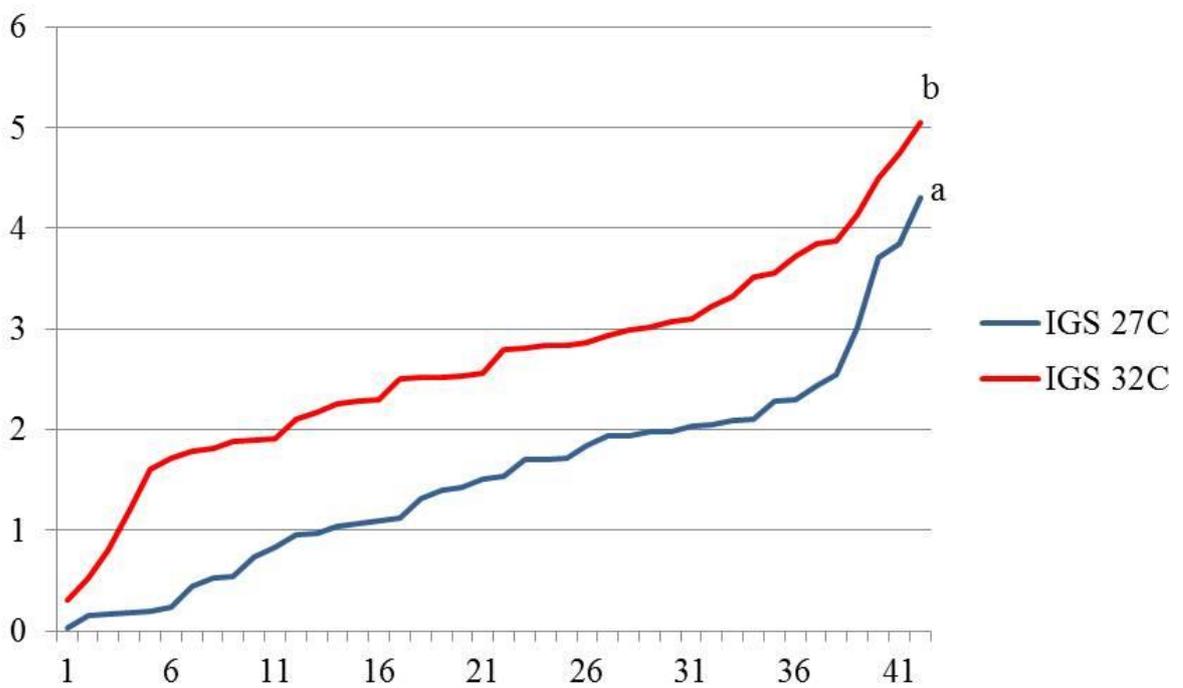
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 7: Fases do desenvolvimento testicular de *Astyanax altiparanae*. A e B: Maturação final. C, D e E: Regressão. Lu: Lúmen. EspZ: espermatozoides. CP: células picnóticas. Tr: Tecido sendo reabsorvido. Coloração: Hematoxilina/Eosina.



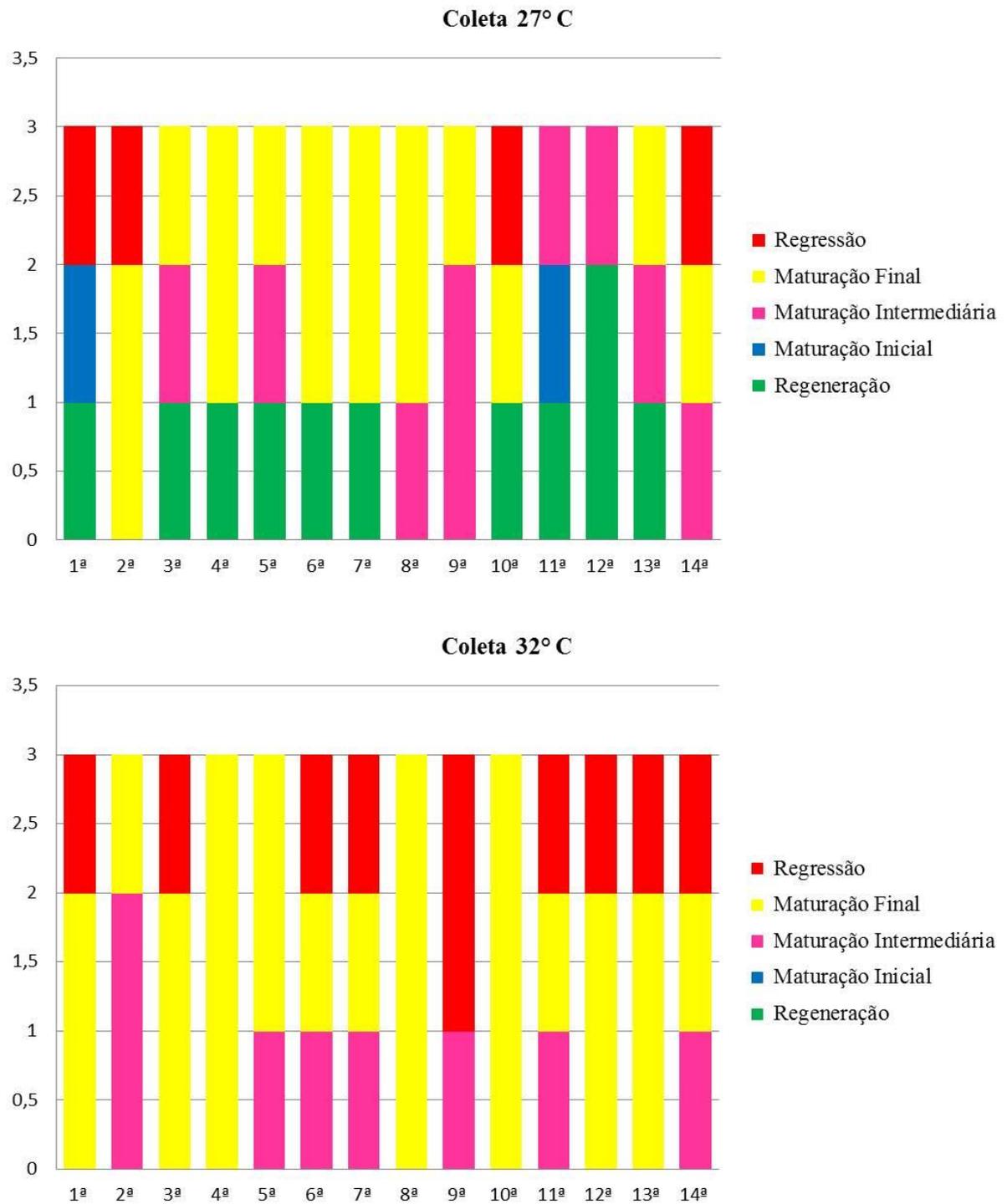
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 8: Índice Gonadosomático (IGS) de *Astyanax altiparanae* em 27°C e 32°C. Eixo X: n° de animais; Eixo Y: valor de IGS. Dados submetidos a análises por meio de Teste-T.



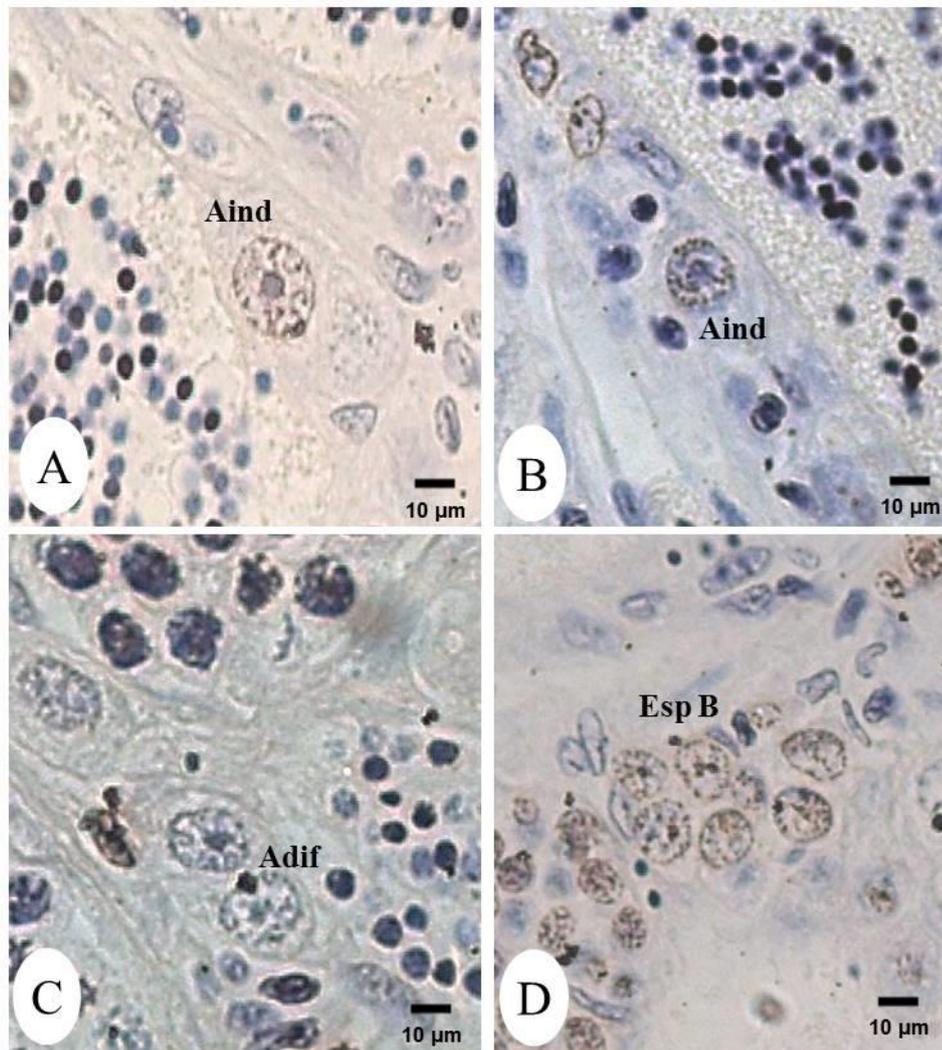
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 9: Frequência (quantidade) de espécimes de *Astyanax altiparanae* por fases de maturação testicular para cada coleta.



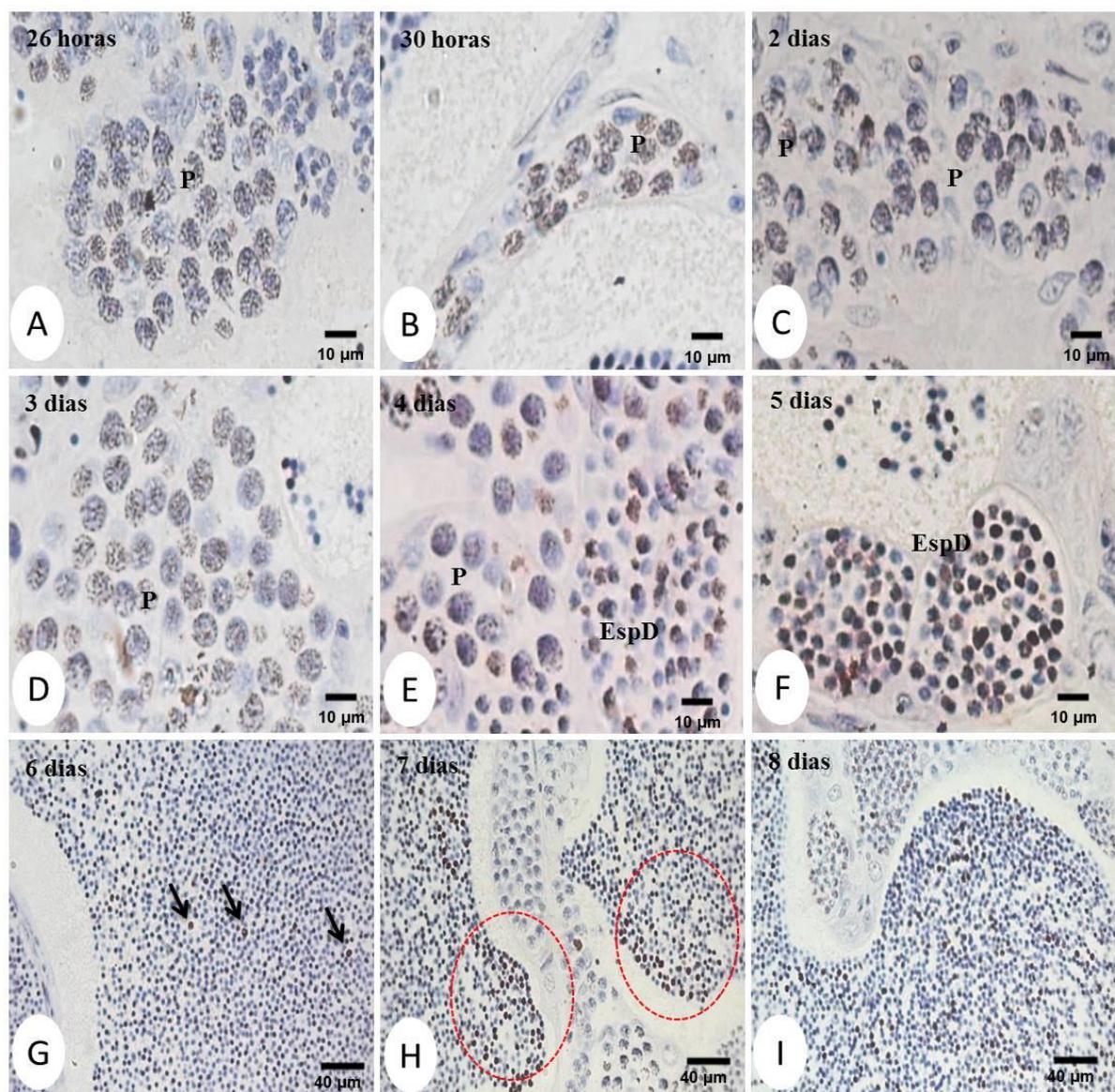
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 10: Tipos espermatogoniais em *Astyanax altiparanae* que retiveram BrdU em 27°C. A e B: Espermatogônias indiferenciadas (Aind.). C: Espermatogônias diferenciadas (Adif). D: Espermatogônias B. Coloração: Hematoxilina.



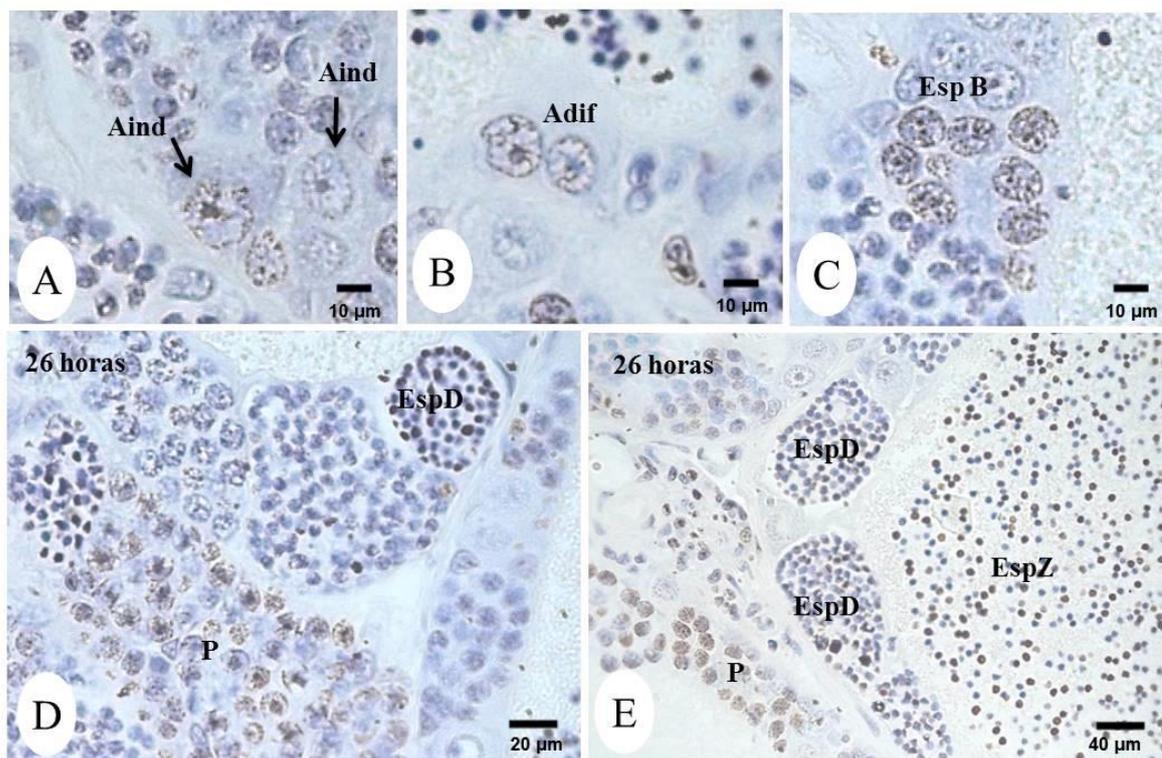
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 11: Duração da espermatogênese em *Astyanax altiparanae* a 27°C. A, B, C e D: Marcação em células em paquíteno (P) após 26h, 30h, 2 dias e 3 dias, respectivamente, após a primeira exposição ao marcador. E e F: Marcação em espermatídias (EspD) 4 e 5 dias, respectivamente. G, H e I: Marcação em espermatozoides. Setas: espermatozoides. Circunferência: grande quantidade de espermatozoides marcados no lúmen. Coloração: Hematoxilina.



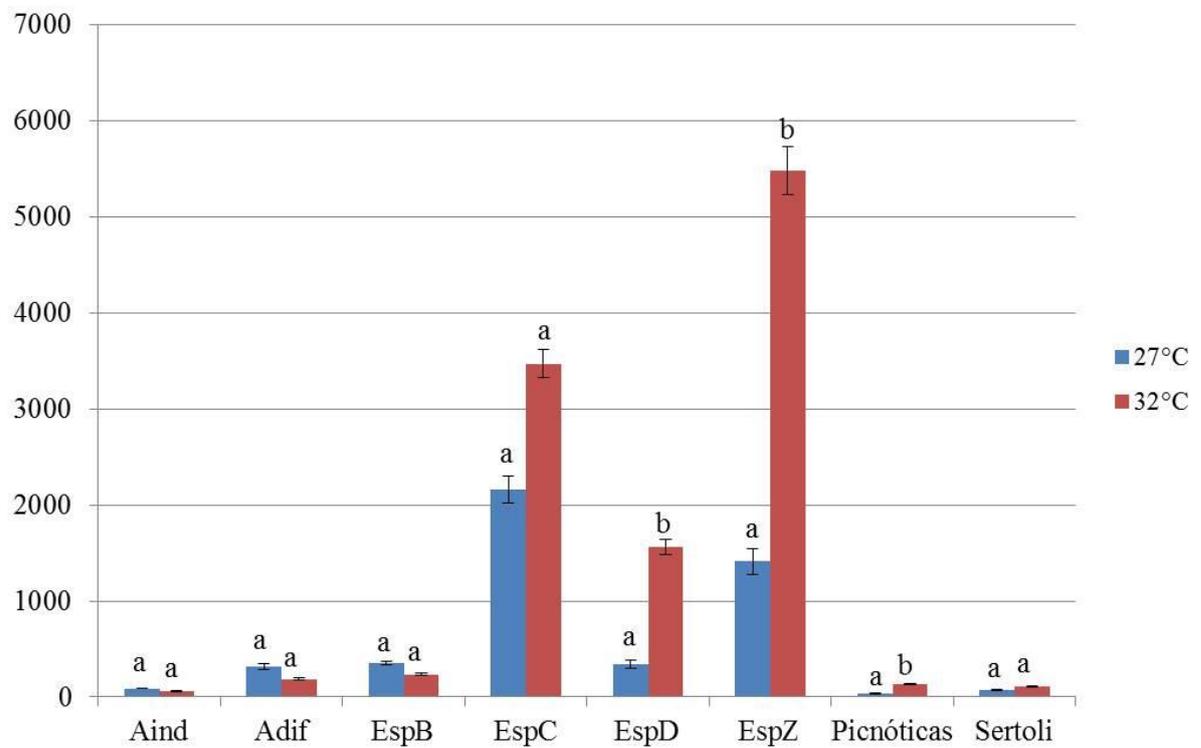
Fonte: Dados da própria autora.

Figura 12: Duração da espermatogênese em *Astyanax altiparanae* a 32°C. A: Marcação em espermatogônias A-indiferenciadas (Aind).. B: Marcação em espermatogônias A-diferenciadas (Adif). C: Cisto de espermatogônias B (Esp B) marcado. D e E: Testículos com marcação em todos os tipos celulares, incluindo espermatozoides, após 26h de exposição ao marcador BrdU. EspD: Espermátides. P: espermátocitos em paquíteno. EspZ: espermatozoides. Coloração: Hematoxilina.



Fonte: Dados da própria autora.

Figura 13: Análise estereológica da marcação celular na espermatogênese de *Astyanax altiparanae*. As análises de Aind, Adif, EspB e Células de Sertoli foram submetidas a Teste-T. As análises de espermatócitos (EspC), espermátides (EspD), espermatozoides (EspZ) e células picnóticas foram submetidas a Teste-U.



Fonte: Dados da própria autora.

8 REFERÊNCIAS

ADAMOV, N. S. M.; NASCIMENTO, N. F.; MACIEL, E. C. S.; PEREIRA-DOS-SANTOS, M.; SENHORINI, J. A.; CALADO, L. L.; EVANGELISTA, M. M.; NAKAGHI, L. S. O.; GUERRERO, A. H. M.; FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S. Triploid induction in the yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, using temperature shock: tools for conservation and aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, 1-10, 2016.

ALVARENGA, E. R.; FRANÇA, L. R. Effects of diferente temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Biology of Reproduction**, v.80, p.537-544, 2009.

BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in the Brazilian teleost fish species. **European Archives of Biology**, Leige, v. 10, p. 399-410, 1990.

BILLARD R. La spermatogènese de *Pecilia reticulata*. IV. La espermiogènese. Etude ultrastructurale. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v.10, p.493-510, 1970.

BRETON, B. et al. Effects of photoperiod and temperature on plasma gonadotropin and spermatogenesis in the rainbow trout *Salmo gairdnerii* Richardson. In: **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**. EDP Sciences, 1977. p. 331-340.

BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, v.3, 52–70, 2011.

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

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**, v.9, 601-616, 2011.

CAHILL, A. E.; AIELLO-LAMMENS, M. E.; FISHER-REID, M. C.; HUA, X.; KARANEWSKY, C. J.; RYU, H. Y.; SBEGLIA, G. C.; SPAAGNOLO, F. WALDRON, J. B.; WARSI, O.; WIENS, J. J. How does climate change cause extinction? **Biological Sciences**, New York, v. 280, p. 1 - 9, 2012.

CAMARGO, M. P. **Caracterização das espermatogônias indiferenciadas e dos nichos espermatogoniais em *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Teostei, Characidae)** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CASATTI, L.; CASTRO, R. M.C. A Fish community of the São Francisco River headwaters riffle southeastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, München, v. 9, n. 3, p.229-242, 1998.

CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; ***Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação.** Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências de Botucatu, 2007. 119 p.

CETESB - **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.** Alterações físicoquímicas da água. [relatório na internet]. São Paulo; 2015. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/causas_oxigenio.php> Acesso em: 15 de janeiro de 2017.

COMTE, L.; BUISSON, L.; DAUFRESNE, M.; GRENOUILLET, G. Climate-induced changes in the distribution of freshwater fish: observed and predicted trends. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 58, p. 625-639, 2013.

COSTA, R. S. Criopreservação embrionária de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1986) submetidos a eletroporação e ultrassom. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2017.

CREPALDI, D. V. et al. Biologia reprodutiva do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, p.159-167, dez, 2006.

DE ROOIJ, D.G. and RUSSELL, L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of Andrology**, v. 21, 776-798, 2000.

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

DJORDJEVIC, B.; SZYBALSKI, W. Incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridina ou BrdU into the deoxy-ribonucleic acid oh human cells and its effect on radiation sensitivity. **Genetics of Human Cell Lines**, v. 3, 509-531, 1960.

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**, Australia, v. 401, 233-243, 2010.

DOS SANTOS SILVA, A. P. **Biologia reprodutiva de fêmeas de *Laetacara araguaiaie* (Labriformes: Cichlidae)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Programa de Ciência e Tecnologia Animal, 2014.

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.

FRASER, E. J.; BOSMA, P. T.; TRUDEAU, V. L.; DOCHERTY, K. The Effect of water on the GABAergic and reproductive systems in female and male golfsfish (*Carassius auratus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, 163-175, 2002.

FRAILE, B.; SÁEZ, F. J., VICENTINI, C. A., GONZÁLEZ, A., DE MIGUEL, M. P., PANIAGUA, R Effects of temperature and photoperiod on the *Gambusia affinis holbrooki* testis during the spermatogenesis period. **Copeia**, p. 216-221, 1994.

GARCIA, S. M. L; FERNANDEZ, C. G., **Embriologia**. Porto Alegre: Artmed, 2001. 416 p.

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. **Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Série Zoologia**. v.13, p.65-88, 2000.

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.; LINTON, J.R.; LEATHERLAND, J.F.; DE VLAMING, V.L. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. **Am. J. Anat.**, v.159, p.331-45, 1980.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **AMER. ZOOL.**, v. 21, 345-357, 1980.

GRIER, H.J. Chordate Testis: The Extracellular Matrix Hypothesis. **Journal of Experimental Zoology**, v.261, p.151-60, 1992.

GRIER, H.J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. The Sertoli Cell. **Clearwater, FL**: Cache River Press, p.704-739, 1993.

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

GRIER, H. J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. **Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, v. 53, 537-580, 2002.

HAKALA, M. T. Mode of Action of 5-Bromodeoxyuridine on Mammalian Cells in Culture. **The Journal of Biological Chemistry** , V. 234, 3072-3076, 1959.

IPCC - INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Mitigation of Climate Change** [relatório na internet]. Cambridge, 2014. Disponível em :

<http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg3/ipcc_wg3_ar5_full.pdf> Acesso em: 15 de janeiro de 2017.

JONSSON, B.; JONSSON, N. Trans-generation maternal effect: temperature influences egg size of the offspring in Atlantic Salmon *Salmo salar*. **Journal of Fish Biology**, v. 89, 1482-1487, 2016.

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

LADEIRA, A. L. F.; VIEIRA, U. V.; CAMPELO, D. A. V.; ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L. Comportamento alimentar e taxa de mortalidade de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas da água. **XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia: Dimensões sociais e tecnológicas da zootecnia**. Fortaleza, 2015.

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*, 81:77-187, 2009

LEVKOFF, L. H.; MARSHALL, G. P.; ROSS, H. H.; CALDEIRA, M.; REYNOLDS, B. A.; CAKIROGLU, M.; MARIANI, C. L.; STREIT, W. J.; LAYWELL, E. D. Bromodeoxydiuridine inhibits cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. **Neoplasia: Australia**, v. 10, n.8, 804-821, 2008.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F.. **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Organized by Roberto E. Reis, Sven O. Kullander, Carl J. Ferraris, Jr - Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 742 p.

MAJHI, S. L. CHOUDHARY, B. K. Elevated Water Temperature Induces Germ Cell Proliferation in Loach *Lepidocephalus guntea* (Hamilton): Implication for Brood Stock Development. **Natl. Acad. Sci. Lett**, V. 37, 107–111, 2014.

MARENCO, J. A. **Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade: caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente: Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2006.

MELO, R. M.; RIBEIRO, Y. M.; LUZ, R. K., BAZZOLI, N., RIZZO. Influence of low temperature on structure and dynamics of spermatogenesis during culture of *Oreochromis niloticus*. **Animal reproduction Science** 172 (2016): 148-156.

MOJICA, C. A. P. **Morfologia testicular e estrutura da espermatogênese em peixes ornamentais Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*; Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques* (Teleostei, Characiformes)**. Tese

(doutorado) Curso de pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, Jaboticabal, 2007. 95 p.

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**, v. 5, 2010.

NUNES, L. H. **Repercussões globais, regionais e locais do aquecimento global**. Terra Livre, São Paulo, v. 1, 101-110, 2003.

OLIVEIRA, M. A. **Nicho espermatogonial em *Cyprinus carpio* e papel do Amh na espermatogênese**. Dissertação (mestrado). Curso de pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, Jaboticabal, 2014, 84p.

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.

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.

QUINTANA, L., SILVA, A.; BEROIS, N.; MACADAR, O. Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity indicators in *Brachyhypopomus pinnicaudatus* from a temperate climate. **The Journal of Experimental Biology**, V. 207, 1843-1853, 2004.

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**, v.44, p.333-348, 2004.

PEDROZO, C. S.; KAPUSTA, S. C. **Indicadores Ambientais em Ambientes Aquáticos**. Porto Alegre : Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, 2010. 72 p.

PEREIRA DOS SANTOS, M., YASUI, G. S.; XAVIER, P. L. P.; ADAMOV, N. S. M.; DO NASCIMENTO, N. F.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A., NAKAGHI, L. S. O. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, Cambridge, 1-13, 2016.

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

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**, Philadelphia, v. 132, p. 739-761, 2002.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). IN: **Espécies Nativas para Piscicultura**. Santa Maria: Ed UFMS, 2005, 468p.

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

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

RUFINO, M. D. **Aquecimento global: questões e discussões. Trabalho de Conclusão de Curso: Graduação em Geografia**. Universidade Estadual da Paraíba, 2014.

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.

- SATO, Y; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia Reprodutiva e Reprodução Induzida de Duas Espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da Bacia da São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 1, p. 267-273, 2006.
- 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, 891-898, 2005.
- 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**, v.165, 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 v.1, p. 616–626, 2011.
- SCHULZ, R. W. , NÓBREGA, R. H. Regulation of Spermatogenesis. In: Farrell A.P., (ed.), **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**, San Diego: Academic Press v.1, p. 627–634, 2011.
- 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, nº 3, 2007.
- 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.
- TUCCI, C.E.M. **Hidrologia: Ciência e Aplicação**. Porto Alegre, Editora da UFRGS/ABRH, 2004.
- URIBE, M. C.; GRIER, H. J.; MEJÍA-ROA, V. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. **Spermatogenesis**, v. 4, 2015.
- VAN DE KANT, H. J. G.; DE ROOIJ, D. G. Periodic acid incubation can replace hydrochloric acid hydrolysis and trypsin digestion in immunogold-silver staining of

bromodeoxyuridine incorporation in plastic sections and allows the PAS reaction.

Histochemical Journal, v.24, p.170–175, 1992.

VAZZOLER, A. E. A. de M. Manual de métodos para estudo biológico de populações de peixes: reprodução e crescimento. Brasília, CNPq/Programa Nacional de Zoologia. 1981, 108p.

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

VIGOYA, A. A. A. **Transplante de espermatogônias tronco em peixes teleósteos, utilizando como modelo experimental a carpa comum (*Cyprinus carpio*)**. Tese (Doutorado). Curso de pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, Jaboticabal, 2016. 98 p.

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

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