Revista da Biologia (2019) 19(1): 31-40
DOI: 10.7594/revbio.19.01.04

Artigo

Dinâmica da maturação testicular durante o ciclo reprodutivo de *Salminus hilarii* (Teleostei, Characidae) em ambiente natural

Dynamics of testicular maturation during the reproductive cycle of *Salminus hilarii* (Teleostei, Characidae) in a natural habitat

Renato Massaaki Honji[1]*, Juliane Suzuki Amaral[2], Maria Inês Borella[3], Sérgio Ricardo Batlouni[4] & Renata Guimarães Moreira[2]

[1]Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo (CEBIMar). Rodovia Manoel Hypólito do Rego, km 131,5, 11612-109, Pitangueiras, São Sebastião, SP, Brasil. [2]Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, Travessa 14, 321, 05508-090, São Paulo, SP, Brasil. [3]Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. [4]Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, S/N, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

*Contato: honjijp@usp.br; Tel.: +55 12 38628459; Fax: +55 11 30918095.

Recebido: 19jun19
Aceito:03dez19
Publicado: 31jan20

Editado por Henrique Rodrigues Vieira e diagramado por Karen S. Toledo

Resumo. O objetivo foi descrever as alterações morfofisiológicas dos testículos de *Salminus hilarii* durante o ciclo reprodutivo anual. Os animais foram coletados na Bacia do Alto Tietê entre as cidades de Salesópolis e Biritiba Mirim (SP). As análises macro/microscópicas dos testículos permitiram classificar o desenvolvimento em três estádios (pré-espermatogênico, espermatogênico e regressão) e identificar seis tipos celulares (espermatogônias, espermatócitos, espermátides, espermatozoides, células de Sertoli e Leydig). As concentrações plasmáticas de estrógeno/progestágeno não variaram durante o ciclo reprodutivo. Entretanto, os andrógenos, testosterona e 11-cetotestosterona, aumentaram progressivamente com a maturação testicular (alteração do epitélio germinativo contínuo para descontínuo) e concomitantemente com o aumento do índice gonadossomático. Estes resultados morfofisiológicos sugerem que o período reprodutivo ocorre entre os meses de setembro a fevereiro.
Palavras-chave. *tabarana; reprodução; estradiol; testosterona; 11-cetotestosterona.*

Abstract. The objective was to describe the morphophysiological changes of *Salminus hilarii* testis during the annual reproductive cycle. The animals were collected in the Alto Tietê River Basin between Salesópolis and Biritiba Mirim cities (SP). Macro/microscopic analyzes of the testes allowed the classification of three stages (prespermatogenic, spermatogenic and regression) and six cell types (spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa, Sertoli and Leydig cells). The plasma concentration of estrogen/progestogen did not change during the reproductive cycle. However, androgens, testosterone and 11-ketotestosterone increased progressively with testicular maturation (continuous germ-to-discontinuous epithelial changes) and concomitantly with increased gonadosomatic index. These morphophysiological results suggest that the reproductive period occurs between the months of September to February.
Keywords. *tabarana; reproduction; estradiol; testosterone; 11-ketotestosterone.*

Introdução

A tabarana *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1850), pertence à classe Actinopterygii, Família Characidae (Ordem Characiformes), distribuindo-se nos rios das bacias do Alto Paraná, São Francisco e Tocantins, sendo encontrada também nos rios das bacias do Alto Amazonas e Alto Orinoco (Lima *et al.*, 2007; Marceniuk & Hilsdorf, 2010). *S. hilarii* é uma espécie carnívora (piscívora), de porte médio, voraz, apresentando duas séries de dentes cônicos, pontiagudos e com as pontas voltadas para o interior da boca (Lima *et al.*, 2007). Possui coloração branca-prateada, nadadeira caudal vermelha, nadadeiras peitorais, pélvicas, dorsal e anal levemente tingidas de vermelho. *S. hilarii* é uma espécie migradora (peixe de piracema), ou seja, precisa durante um determinado período do ciclo reprodutivo, subir até as cabeceiras dos rios para a reprodução (Honji *et al.*, 2009, 2011a). Essa migração é necessária para o desenvolvimento de suas gônadas, maturação e posteriormente a desova (Honji *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2015).

O Rio Tietê nasce em Salesópolis/SP, aproximadamente a 95 km da Capital do Estado e a partir do município de Mogi das Cruzes/SP, devido à poluição industrial e esgoto sem tratamento começa a apresentar problemas na qualidade de suas águas. Desta forma, desde a nascente em Salesópolis até a região de Mogi das Cruzes, pode-se dizer que o Rio Tietê apresenta apenas um pequeno trecho onde as espécies ícticas sobrevivem sem maiores problemas. *S. hilarii* já foi encontrada em abundância nos Rios Tietê e Pinheiros e em seus afluentes, em trechos da Capital, como relatado por von Ihering (1929) que comenta uma grande piracema de tabaranas no Rio Tamanduateí (afluente do Rio Tietê), em que um grande número de indivíduos invadiu a várzea do rio e centenas de quilos da espécie foram capturadas pelos pescadores. No entanto, hoje em dia, *S. hilarii* está reduzida a poucos cardumes, confinada em alguns quilômetros desse rio e seus tributários. Outro fato agravante é que a bacia do Alto Tietê apresenta atualmente muitos problemas, que podem colocar em risco a qualidade da água e a diversidade da fauna e flora. Entre os problemas mais evidentes para a ictiofauna estão a poluição e as barragens (reservatórios), sendo que estes últimos causam grandes problemas para as espécies reofílicas (Silva *et al.*, 2006).

Os estudos sobre a biologia de *S. hilarii* eram esparsos e começou a se alterar a partir de 2005, quando *S. hilarii* passou a ser utilizada como modelo de estudos fisiológicos na Região da Bacia do Alto Tietê, relacionando-se ainda os aspectos ambientais dessa região. Um novo esforço de trabalho vem sendo dirigido a esta importante espécie, gerando conhecimento sobre a mesma e preenchendo lacunas no conhecimento biológico desta importante espécie neotropical, como se constata nos trabalhos sobre perfil de esteroides sexuais e expressão de *fshβ* e *lhβ* em fêmeas (Moreira *et al.*, 2015), mobilização de substratos energéticos em fêmeas (Camargo, 2007), fecundidade e desenvolvimento ovariano (Honji *et al.*, 2009), caracterização histológica e imuno-histoquímica das células da adeno-hipófise de fêmeas (Honji *et al.*, 2013), efeitos do bloqueio migratório no eixo hipófise–gônadas de fêmeas (Amaral *et al.*, 2007) e indução artificial a reprodução em cativeiro (Honji *et al.*, 2011a). Além desses estudos, encontra-se disponível na literatura especializada uma abordagem geral da biologia reprodutiva (Andrade *et al.*, 2006; Takahashi, 2006), aspectos da sistemática e taxonomia (Lima *et al.*, 2007) e alimentação (Villares Junior & Goitein, 2015, 2016). Os trabalhos supracitados abordam temas gerais dentro da biologia básica de fêmeas de *S. hilarii*, mas nenhum estudo foi realizado até o momento, com foco na biologia/fisiologia de machos desta espécie.

Nos machos de teleósteos, o controle fisiológico da síntese de esteroides sexuais é semelhante ao descrito para as fêmeas (que é mais descritos e estudado se comparado aos machos). O hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) estimulam a esteroidogênese testicular e espermatogênese, sendo os andrógenos, testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) produzidos pelas células de Leydig no tecido intersticial dos testículos, sendo, esses hormônios gonadais os mais importantes no desenvolvimento dos testículos e das características sexuais secundárias nos machos (Grier, 1993; Levavi-Sivan *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2010; Zohar *et al.*, 2010). Os estrógenos e os progestágenos apesar de serem considerados hormônios "femininos" são comumente sintetizados e secretados na corrente sanguínea em machos de vertebrados, sendo que, em machos de teleósteos, os estrógenos são sintetizados e secretados em baixas concentrações plasmáticas e para os progestágenos há referências indicando um papel fundamental na espermiação e no início da proliferação espermatogonial (Schulz *et al.*, 2010). Portanto, os esteroides sexuais apresentam um papel importante no controle da espermatogênese em peixes teleósteos.

Levando em consideração essas informações, os principais objetivos do presente estudo foram: 1) descrever os aspectos macro- e microscópico do desenvolvimento testicular de *S. hilarii*; 2) relacionar o perfil plasmático dos esteroides sexuais (17β-estradiol (E_2), 17α-hidroxiprogesterona (17-OHP), testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT)) com o desenvolvimento testicular. Os resultados obtidos no presente estudo, somados ao conhecimento da biologia/fisiologia de fêmeas de *S. hilarii*, fornecem subsídios para aperfeiçoar o método de reprodução induzida dessa espécie em pisciculturas de conservação, contribuindo para um melhor desempenho reprodutivo em cativeiro, o que auxiliará no programa de repovoamento na Bacia do Alto Tietê e tributários.

Materiais e Métodos

Coleta de machos de S. hilarii e amostragem biológica

Machos adultos de *S. hilarii* foram capturados por pescadores artesanais no ambiente natural entre dois pontos da Bacia do Alto Rio Tietê (Figura 1). O primeiro ponto, os animais foram pescados na calha principal do Rio Tietê (23° 32' 45,3"S e 46° 08' 03,2" W) e o segundo ponto, na saída da barragem de Ponte Nova (também na região do Alto Rio Tietê) (230 34' 36,5"S e 450 54' 23,9" W). A frequência de amostragem foi planejada de acordo com o ciclo reprodutivo da espécie congenérica S. brasiliensis (Weingartner & Zaniboni-Filho, 2005) e fêmeas de *S. hilarii* (Honji *et al.*, 2009). Os animais foram capturados utilizando-se a pesca artesanal (vara e isca viva), e essas coletas foram realizadas entre os meses de abril de 2004 e outubro de 2005, levando-se em consideração o estádio do ciclo reprodutivo ao longo do ano. Entretanto, é importante salientar que o número de animais, nas diferentes fases do ciclo reprodutivo, coletados ao longo desse ciclo não foi homogêneo, pois, existiu uma dependência na captura pelos pescadores e pelo regime pluviométrico. Além disso, a quantidade de fêmeas capturadas nas campanhas de amostragem (Honji *et al.*, 2009) foi sempre superior a quantidade de machos capturados (pré-espermatogênico (n=4); espermatogênico (n=5) e regressão (n=7)). Adicionalmente, a coleta dos animais no ambiente natural foi realizada com licença ambiental de captura do IBAMA (licença n° 125 de 29 de dezembro de 2004).

Os machos coletados foram imediatamente transportados ao laboratório e anestesiados por imersão em

água contendo MS-222 (tricaína metanosulfonato, *Sigma Diagnostics INS*, St. Louis M.O. USA) neutralizado com bicarbonato de sódio na proporção de 1g/10L. Em seguida uma amostra de sangue foi coletada por punção da vasculatura caudal, com uso de seringas de 5 ml e agulhas descartáveis previamente heparinizadas (Liquemine – Roche®). O sangue coletado foi transferido para tubos também heparinizados e centrifugado por 10 minutos a 655,2 g. Em seguida o plasma foi separado em alíquotas e acondicionado em criotubos, congelado imediatamente em gelo seco e posteriormente armazenado em freezer à -80ºC até as análises do perfil plasmático dos esteroides sexuais.

Posteriormente à coleta de sangue, o comprimento total (L_t, em cm) e a massa corporal total (W_t em g) foram registradas e, logo após este procedimento, os animais foram eutanaziados por secção da medula espinhal de acordo com o Comitê de Ética Animal da Universidade de Mogi das Cruzes (CEMEA 0.28.04). Os animais foram dissecados e os testículos foram rapidamente removidos, pesados (W_g em g) e o terço médio do lóbulo direito do testículo foi fixado em solução de Bouin acético por 24 horas. O índice gonadossomático (IGS) [IGS = (W_g / W_t) x 100] (Vazzoler, 1996) e as análises histológicas foram utilizadas para a classificação do desenvolvimento testicular de *S. hilarii*.

Análises histológicas

Para as análises histológicas, os testículos fixados foram processados de acordo com a metodologia descrita por Honji *et al.* (2009). Rapidamente, as amostras fixadas foram desidratadas gradualmente com uma série crescente de etanol, clareadas e diafanizadas em dimetilbenzeno (xilol), infiltradas e incluídas em Paraplast (Erv-Plast; Erviegas Instrumental Cirúrgico, São Paulo, Brasil) e os cortes de 5µm de espessuras foram realizados em micrótomo (Leica – RM/2155, equipado com lâminas descartáveis). Os cortes obtidos foram montados em lâminas com poli-lisina (*Poly-Lysine Solution* – Sigma Diagnostics INS, St. Louis M.O. USA) diluída em 1:3 (em água destilada), para auxiliar a fixação dos cortes nas lâminas. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (Behmer *et al.*, 1976). Em seguida, o material foi novamente desidratado, diafanizado e montado com lamínula e goma Damar. As lâminas foram analisadas sob microscopia de luz (Leica DM1000) e documentadas em um sistema de captura de imagens (câmera Leica DFC295 e software de captura de imagens *Application Suite Professional Software, LAS V3.6*).

Análises dos esteroides sexuais plasmáticos

O perfil plasmático de E_2, 17-OHP, T e 11-KT foram quantificados por elisaimunoensaio (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA). Para E_2, 17-OHP e T (*Diagnostic Systems Laboratories*, Texas, USA) e para 11-KT (*Cayman Chemical Company*, Michigan, USA), as análises foram realizadas em duplicata com "kits" comerciais. As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitora de microplaca (Tecan Sunrise, NC, USA).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as especificações dos fabricantes. Um ensaio piloto utilizando 3 diferentes diluições de 3 distintas amostras foi realizado para estabelecer a melhor diluição de trabalho. A validação dos kits comerciais para *S. hilarii* foi determinado calculando os coeficientes de variação (%CV) intra- e inter ensaios, sendo que, o limite aceitável para CV foi ≤20,0 (Sink *et al.*, 2008). Além disso, a metodologia de ELISA já foi validada para *S. hilarii* (Moreira *et al.*, 2015). Para o presente estudo, os limites para intra- e inter ensaio foram (mínimo-máximo): 0,69-14,76 e 3,32-16,54 % para E_2; 1,50-16,80 e 2,92-18,97 % para 17-OHP; 0,87-19,48 e 0,21-2,48 % para T; 0,15-15,49 e 0,75-1,21 % para 11-KT. Os limites de detecção dos ensaios (de acordo com os fabricantes) foram: 10pg/ml para E_2, 50pg/ml para 17-OHP,

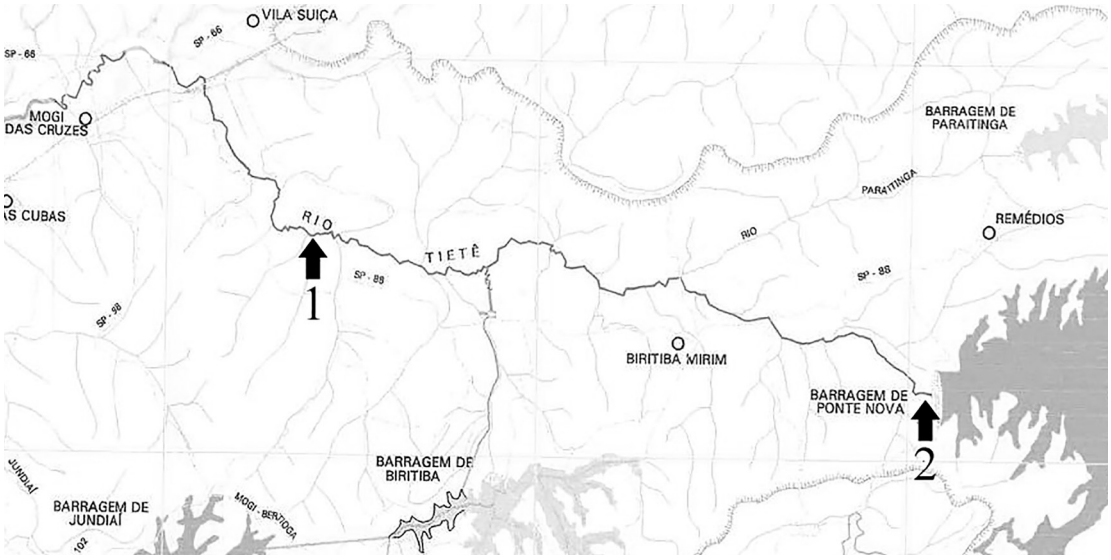

Figura 1. *Salminus hilarii*: Representação esquemática da Bacia do Alto Rio Tietê, apresentando a calha principal do Rio Tietê entre as cidades de Biritiba Mirim (1) e a saída da Barragem de Ponte Nova, em Salesópolis (2). Fonte: DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica).

70pg/ml para T e 1,3pg/ml para 11-KT.

Análises de dados

Para as análises de resultados, o total de animais coletados no presente estudo foi agrupado levando em considerações os dados obtidos nas análises histológicas (mesmo estádio de maturação gonadal), nos valores de IGS e nas características macroscópicas dos testículos (coloração e tamanho ocupado na cavidade abdominal dos animais). Para as identificações das diferenças estatísticas entre os estádios de maturação gonadal, referente aos dados morfométricos e ponderais (comprimento total e massa corpórea), dos valores de IGS e de IHS e do perfil plasmático dos esteroides sexuais (T, 11-KT, E_2 e 17-OHP) foram realizadas análises de variância (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey's*. Adicionalmente, os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (Média ± EPM) e as análises foram realizadas, utilizando-se o programa estatístico *SigmaStat for Windows* (Version 3.10 Copyright©).

Resultados

Todos os animais capturados neste estudo eram sexualmente maduros e apresentaram a nadadeira anal áspera, com presença de espículas. O comprimento total e a massa corpórea total variaram entre (mínimo-máximo) 22,5 e 35,5 cm (com média de 27,10 ± 1,0 cm) e 110,00 e 400,00 g (com média de 205,60 ± 23,70 g). Os parâmetros biomnétricos de *S. hilarii* coletados no ambiente natural estão apresentados na Tabela 1.

Desenvolvimento testicular: análises macroscópicas e microscópicas

Os testículos de *S. hilarii* são órgãos pares, tubulares e alongados e menores que os ovários (observação pessoal), e que durante o desenvolvimento se tornam esbranquiçados.

As análises histoquímicas dos testículos permitiram identificar as células de linhagens germinativas. Essa identificação foi realizada obedecendo-se a ordem do processo espermatogênico, com base nas características observadas na microscopia de luz, além das estruturas testiculares (características morfológicas do citoplasma, núcleo e tamanho das células):

Espermatogônias: são as maiores células da linhagem germinativas se comparadas com espermatócitos e espermátides. São as células mais fáceis de serem identificadas no epitélio germinativo devido ao seu tamanho, por serem esféricas e por apresentarem núcleo grande de posição central (Figura 2a). O citoplasma dessas células é abundante e pouco corado;

Espermatócitos: são células germinativas bem menores se comparados com as espermatogônias, devido à diminuição do volume citoplasmático (Figura 2a). O núcleo ainda é central e essas células ainda continuam em ninhos delimitados pelas células de Sertoli. O citoplasma desta célula é pouco distinguível, devido ao pequeno volume;

Espermátides: são as menores células que permanecem em cistos (pequenas células esféricas), possuem um citoplasma escasso e são densamente coradas (Figura 2a);

Espermatozoides: essas células apresentam flagelos, e no momento em que ocorre o rompimento dos cistos, os espermatozoides são liberados para o túbulo seminífero (Figura 2b). Essas células também são densamente coradas como as espermátides, mas não se apresentam em forma de cistos;

Células de Sertoli: o citoplasma dessa célula é escasso, núcleo basófilo e evidente. O aspecto morfológico é de uma célula com forma piramidal e com um contorno irregular, além do núcleo na periferia da célula. É possível observar os prolongamentos dessas células (Figura 2c);

Tecido intersticial: nesse tecido foram observadas células de musculatura lisa, vasos sanguíneos, além das células de Leydig, que possuem citoplasma acidófilo (Figura 2d).

Adicionalmente, no compartimento dos testículos de S. hiarii, foi observado que as espermatogônias estão distribuídas por toda sua extensão, podendo ser classificado como do tipo espermatogonial irrestrito.

Criou-se uma escala de maturidade para os testículos de *S. hilarii*, levando-se em considerações as observações macroscópicas e microscópicas, além dos valores individuais de IGS. Abaixo segue a escala de maturidade gonadal para *S. hilarii*:

Pré-espermatogênico: macroscopicamente os testículos são pequenos, filiformes, apresentam coloração esbranquiçada, contorno irregular e estendem-se até a região anterior da cavidade abdominal. Microscopicamente, os túbulos seminíferos apresentam cistos com células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos e espermátides), além de apresentar um epitélio germinativo contínuo (Figura 3a), ou seja, em todo o contorno dos túbulos foi observada a presença de cistos germinativos em toda a área;

Maduro (espermatogênico): macroscopicamente os testículos ocupam um espaço considerável na cavidade abdominal e apresentam a coloração esbranquiçada. Adicionalmente, foi observada a presença de espículas na nadadeira anal dos exemplares. Microscopicamente, os lúmens dos túbulos seminíferos apresentam-se repletos de espermatozoides, além de apresentar um epitélio germinativo descontínuo (Figura 3b), no qual, observam-se áreas desprovidas de revestimento (cistos germinativos) e áreas onde permaneciam esses cistos com células em todas as fases de desenvolvimento;

Regressão: macroscopicamente os testículos apresentam uma redução de tamanho em relação à fase madura, além de apresentar um aspecto hemorrágico. Microscopicamente o diâmetro dos ductos foi reduzido e consequentemente, o volume testicular também é reduzido (Figura 3c) se comparado com o maduro (Figura 3d). Além disso, neste estádio é possível observar que o epitélio germinativo é descontínuo, com células de Sertoli e espermatogônias dispersas ao longo dos ductos.

Índice gonadossomático

Alterações no tamanho dos testículos de *S. hilarii*

durante o desenvolvimento gonadal foram macroscopicamente observadas e podem levar ao aumento da massa corpórea total. Os valores médios do IGS aumentaram após o processo de maturação dos testículos diminuindo apenas no estágio de regressão. O valor de IGS foi de 0,78 ± 0,23% no estágio pré-espermatogênico, aumentando para 5,13 ± 0,58% no estágio maduro (estágio espermatogênico) e, em seguida, regredindo para 1,25 ± 0,12% durante o estágio de regressão. As análises de IGS durante o ciclo reprodutivo mostraram um aumento significativo de pré-espermatogênico para o estágio espermatogênico ($P < 0,001$) e diminuiu para o estágio regressão ($P < 0,001$) (Tabela 1).

Análises dos esteroides sexuais plasmáticos

O perfil plasmático dos esteroides sexuais, T, 11-KT, E_2, 17-OHP foram apresentados, respectivamente, nas figuras 4 e 5.

As concentrações plasmáticas de T e 11-KT foram baixas nos estádios pré-espermatogênicos e aumentaram nos estágios espermatogênicos e diminuíram nos estágios de regressão (ambos $P < 0,001$) (respectivamente, Figuras 4a e 4b).

Contrariamente aos andrógenos, o perfil plasmático de E_2 não apresentou diferença estatística entre os distintos estádios de maturação ($P = 0,173$) (Figura 5a). Assim como, para 17-OHP, que também não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($P = 0,357$) (Figura 5b).

Tabela 1. Distribuição morfométrica e ponderal, índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) por estádio de maturação gonadal de *Salminus hilarii* em ambiente natural. Os dados são apresentados por média ± erro padrão da media (M ± EPM). Valores seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes entre os estádios de maturação gonadal ($P<0.05$).

Estádio de maturação	n	Comprimento total (cm)	Massa corpórea total (g)	IGS	IHS
Pré-espermatogênico	4	28,50 +/- 1,54[a]	236,25 +/- 42,49[a]	0,78 +/- 0,23[a]	0,74 +/- 0,10[a]
Espermatogênico	5	28,82 +/- 0,98[a]	248,00 +/- 28,35[a]	5,13 +/- 0,58[b]	0,73 +/- 0,12[a]
Regressão	7	25,00 +/- 1,76[a]	157,71 +/- 40,43[a]	1,25 +/- 0,12[a]	0,82 +/- 0,09[a]

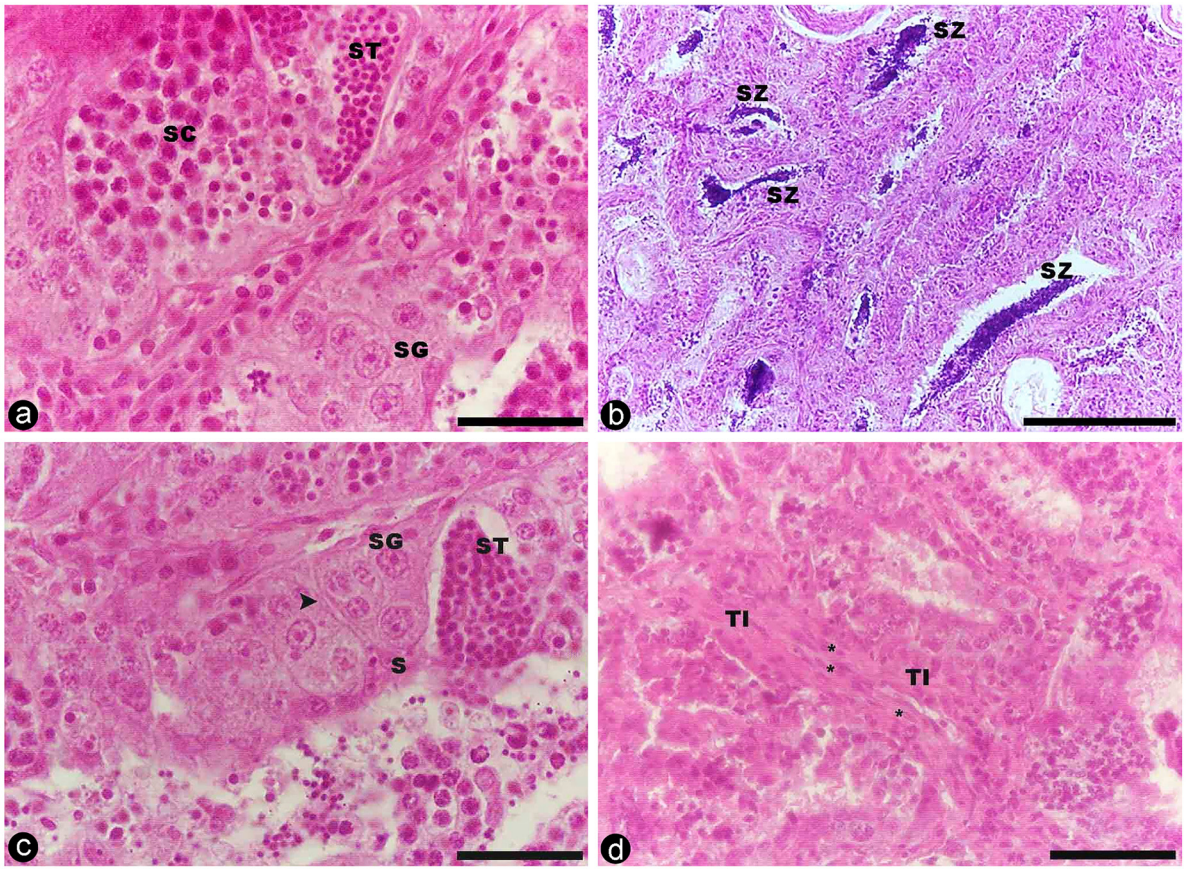

Figura 2. *Salminus hilarii:* Secções histológicas apresentando as diferentes fases de desenvolvimento testicular e os diferentes estádios de maturação gonadal: a) células testiculares: espermatogônias (SG), espermatócitos (SC) e espermátides (ST); b) ductos testiculares com espermatozoides (SZ); c) célula de Sertoli (S), notar os finos prolongamentos dessa célula (cabeça de seta), espermatogônias (SG) e espermátides (ST); d) tecido intersticial (TI), evidenciando as células de Leydig (asterisco). a-d: Hematoxilina e Eosina. Barras: a,c,d = 20µm; b = 100µm.

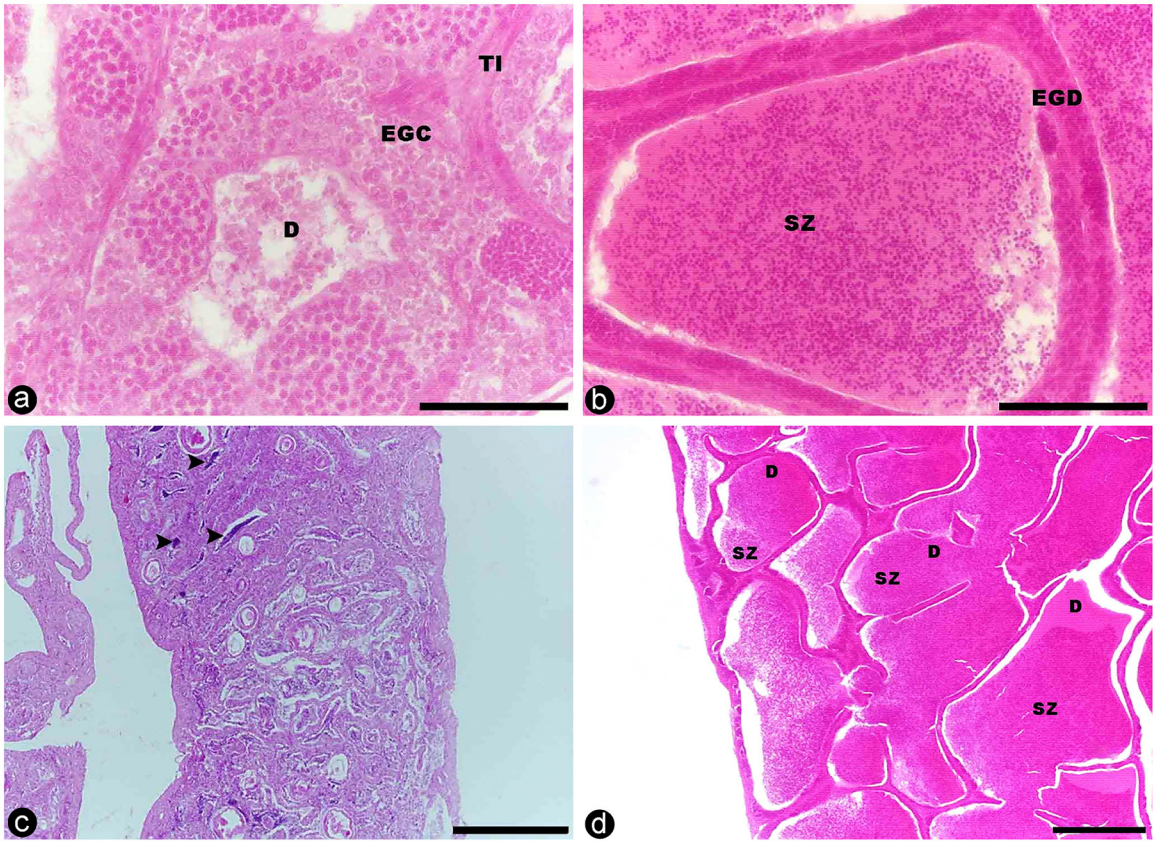

Figura 3. *Salminus hilarii:* Secções histológicas apresentando a alternância de epitélios (contínuo e descontínuo): a) epitélio germinativo contínuo (EGC), ducto (D) e tecido intersticial (TI); b) epitélio germinativo descontínuo (EGD) e espermatozoides (SZ); c) aspecto microscópico de secção transversal de testículo, evidenciando os ductos com espermatozoides residuais (cabeça de seta) em estádio de regressão; d) aspecto microscópico de secção transversal de testículo, evidenciando os ductos (D) repletos de espermatozoides (SZ) em estádio maduro (espermatogênico). a-d: Hematoxilina e Eosina. Barras: a,b = 100µm; c,d = 300µm.

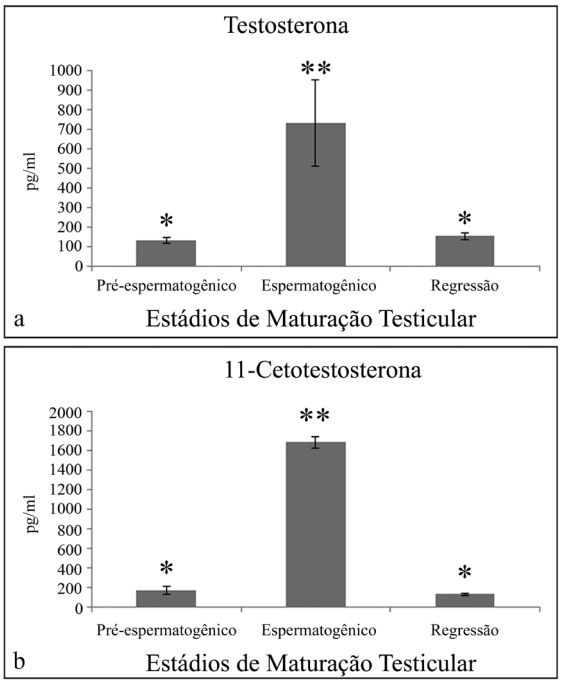

Figura 4. *Salminus hilarii*: Perfil plasmático dos esteroides sexuais por estádio de maturação gonadal: a) Testosterona; b) 11-Cetotestosterona. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média (M ± EPM). Valores seguidos por diferentes símbolos são significativamente diferentes entre os estádios de maturação gonadal (*P<0.05*).

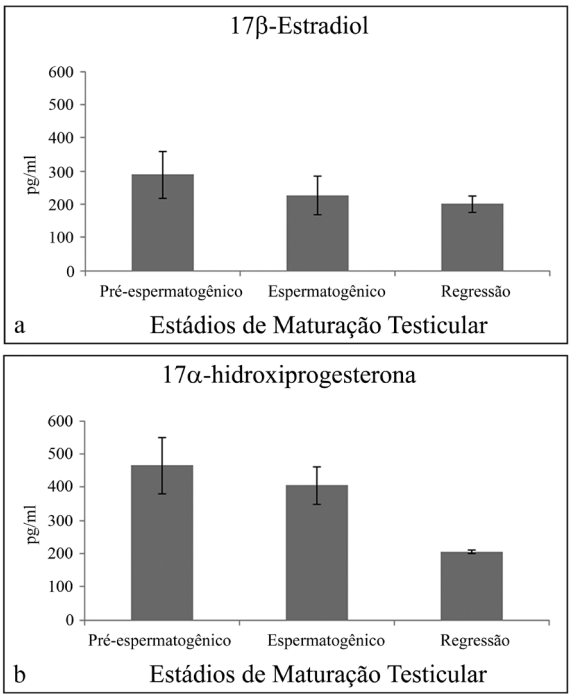

Figura 5. *Salminus hilarii*: Perfil plasmático dos esteroides sexuais por estádio de maturação gonadal: a) 17β-estradiol; b) 17α-hidroxiprogesterona. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média (M ± EPM).

Discussão

Os machos de *S. hilarii* apresentaram nadadeira anal áspera (com a presença de espículas), durante a fase de maturação do ciclo reprodutivo, sendo que, ocorre variação no grau de aspereza ao tato bem como na sua frequência em relação ao desenvolvimento gonadal. Característica de muitas espécies da família Characidae, como reportado em diversos trabalhos (Baldisseroto & Gomes, 2005; Marceniuk & Hilsdorf, 2010). A presença de espículas na nadadeira anal de indivíduos machos tem sido registrada em algumas espécies de teleósteos da família Characidae, como por exemplo: S. brasiliensis (Weingartner & Zaniboni-Filho, 2005), Astyanax altiparanae (Porto-Foresti *et al.*, 2005), Brycon orthotaenia (Sato *et al.*, 2003), entre outras espécies. A ocorrência de nadadeira anal áspera ao toque, tem sido considerada uma característica sexual secundária temporária, presentes somente no período de reprodução (Porto-Foresti *et al.*, 2005) e, portanto, pode ser uma característica utilizada para selecionar os machos aptos para a reprodução em cativeiro.

Em relação às características morfométricas dos machos de *S. hilarii*, se comparado com os dados de comprimento e de massa corpórea de fêmeas capturadas na mesma região do Alto Tietê (Honji *et al.*, 2009), foi possível constatar que as fêmeas apresentam tamanhos e massas maiores do que os machos (40.7 cm para fêmeas e 30.9 cm para os machos). Este padrão de crescimento entre machos e fêmeas é típico de *S. hilarii*, sendo reportado inicialmente por Godoy (1975), Takahashi (2006), Villares-Junior *et al.* (2007) e no presente estudo. As características gerais dos testículos de *S. hilarii*, seguiram o mesmo padrão anatômico da maioria dos teleósteos. Os testículos são órgãos bem menores que os ovários, pares, tubulares e alongados, que ao longo do desenvolvimento se tornam esbranquiçados, como constatado por Takahashi (2006) para *S. hilarii* amostrados na região média do Rio Tietê (próximo ao município de Sorocaba/SP).

De uma forma geral, como o desenvolvimento testicular também altera o tamanho do testículo, consequentemente ocorreu uma alteração na massa corpórea total desses animais. Essa alteração de tamanho é observada também nos valores de IGS, ou seja, conforme o animal torna-se maduro, ocorre um aumento nos valores de IGS, diminuindo no estádio regressão. Takahashi (2006) também relata que os maiores valores de IGS para os machos foi encontrado nos animais no estádio maduro. Além disso, é observado que os machos de *S. hilarii* permanecem maduros por um período mais prolongado se comparados com as fêmeas e apresentam valores de IGS menores do que as mesmas (Honji *et al.*, 2009). O maior valor de IGS encontrado no presente estudo foi no estádio maduro e as análises histológicas dos testículos mostraram que os mesmos apresentam um epitélio germinativo descontínuo e que estavam no estádio maduro, com a presença de muitos espermatozoides nos ductos.

A ocorrência de machos de *S. hilarii* em estágio de regressão no ambiente natural, sugere que o rio Tietê passa por alterações ambientais (por exemplo, baixa qualidade de água, ou a presença de poluentes) que refletem no ciclo reprodutivo das espécies que habitam essa região, como é o caso de *S. hilarii*. A presença de machos em regressão no ambiente natural, também estão de acordo com Honji *et al.* (2009), pois estes autores encontraram oócitos atrésicos em fêmeas de S. hilaii (no mesmo período de amostragem que os machos), sugerindo o mesmo problema para a Bacia do Alto Rio Tietê.

Apesar da diversidade de espécies de vertebrados viventes, de acordo com Grier, (1993) e Schulz *et al.* (2010), os testículos dos vertebrados são classificados em 3 tipos, de acordo com a organização do compartimento germinativo (tubular, tubular anastomosado e lobular). No caso dos testículos tubulares, o compartimento germinativo é formado por túbulos, que não terminam na periferia do testículo e cujas extremidades estão conectadas a um sistema de ductos (rete testis). Esse tipo de testículo (tubular) é encontrado em répteis, aves e mamíferos (amniotas) (Grier, 1993). Com relação à morfologia do compartimento germinativo, a estrutura testicular de *S. hilarii* é constituída por uma rede de túbulos ramificados e anastomosados que não terminam na periferia testicular em fundo cego. Este tipo de testículo é característico de um testículo tubular anastomosado segundo Grier, (1993) e Parenti & Grier (2004).

Ainda sobre a classificação dos testículos, Grier, (1993) apresenta que a estrutura testicular dos teleósteos pode ser dividida em dois grupos, de acordo com a distribuição das espermatogônias ao longo dos testículos. O primeiro tipo é o espermatogonial restrito, ou seja, as espermatogônias estão confinadas na porção terminal distal dos lóbulos, como observado nos Atheriniformes e Cyprinodontiformes (Parenti & Grier 2004); e o segundo tipo é o espermatogonial irrestrito, que neste caso, as espermatogônias estão distribuídas por toda a extensão dos lóbulos, como em Percomorpha (Parenti & Grier 2004). O compartimento germinativo dos testículos de *S. hilarii*, apresentou espermatogônias distribuídas por toda a sua extensão, podendo ser classificado como do tipo espermatogonial irrestrito, como a maioria dos peixes teleósteos considerados mais basal (Parenti & Grier 2004).

Os andrógenos (T e 11-KT) são os hormônios que estimulam o aparecimento de caracteres sexuais secundários nos machos, além de participar no comportamento reprodutivo e diferenciação sexual (Schulz *et al.*, 2010), sendo produzidos pelas células de Leydig e são os hormônios mais importantes na espermatogênese em peixes teleósteos (Birba *et al.*, 2015). Para *S. hilarii*, o perfil plasmático de T e 11-KT também estão de acordo com a literatura especializada, pois esses esteroides gonadais variaram de acordo com a maturação sexual, ou seja, ambos aumentam durante a espermatogênese. Além disso, estes resultados hormonais obtidos no presente estudo, podem ser corroborados pelas análises microscópicas, quando o epitélio germinativo alternou-se de contínuo para descontínuo.

Apesar do perfil plasmático de E_2 em *S. hilarii* não ter variado durante o período reprodutivo, a ação do E2 tem sido bem documentada, apresentando múltiplas funções reprodutivas e não reprodutivas, como alterações metabó-

licas, comportamentais e morfológicas durante o período reprodutivo em fêmeas de peixes teleósteos (Lange *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2005; Mennuet *et al.*, 2005). É bem conhecido que o E_2 produzido pelas células foliculares induz as células hepáticas a sintetizar e secretar a vitelogenina (Zohar *et al.*, 2010; Levavi-Sivan *et al.*, 2010; Mylonas *et al.*, 2010). Embora, o E_2 esteja listado como hormônio feminino, muitos estudos mostraram a presença de E_2 e seus receptores em machos de espécies de vertebrados (Young *et al.*, 2005), no entanto, a específica função do E_2 na reprodução de machos não tem sido estabelecida. Segundo Schulz *et al.* (2010), descrevem que o E_2 está envolvido na regulação da espermatogênese, via interação com as células de Sertoli, com a maior atividade ocorrendo nas fases iniciais da proliferação espermatogonial. Esta informação foi observada no presente estudo, pois a concentração plasmática de E_2 em machos de *S. hilarii* foi ligeiramente elevada no estágio pré-espermatogênico. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar esta regulação da espermatogênese em machos de *S. hilarii*.

O progestágeno 17-OHP é o precursor do *17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one*, considerado como o esteroide responsável pela indução da maturação final e ovulação em peixes teleósteos (Zohar *et al.*, 2010; Mylonas *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2015). No entanto, devido à falta de imunoensaios específicos para 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one em Characiformes (como é o caso de *S. hilarii*), o perfil plasmático do precursor, 17-OHP em algumas espécies de fêmeas de peixes neotropicais apresentaram interessantes interpretações fisiológicas (Amaral *et al.*, 2007; Honji *et al.*, 2011b). Estes estudos supracitados, sugerem que a falha na ovulação e desova em fêmeas reofílicas quando são mantidas em cativeiro é devido a falha na conversão de 17-OHP em 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one. Para machos, estudos fisiológicos das possíveis funções de 17-OHP são escassos e necessitam de maiores esforços para elucidar as funções/participações deste esteroide na fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos. A tendência de altos valores de 17-OHP durante os estágios de pré-espermatogênico e espermatogênico em *S. hilarii*, sugerem a participação dos progestágenos na regulação de várias funções testiculares, como a indução a espermiação (observado em Samonidae) (Schulz *et al.*, 2010), aumento na produção de sêmen (Yueh & Chang, 1997) e estimulação da motilidade dos espermatozoides (Tubbs & Thomas, 2008).

Em resumo, o presente resultado da histologia dos testículos fornece a primeira caracterização histológica do desenvolvimento de testículos em *S. hilarii* no ambiente natural na Bacia do Alto do Rio Tietê. A concentração plasmática de T, 11-KT, E_2 e 17-OHP em machos sugerem sua participação em diferentes estágios de maturação gonadal do ciclo reprodutivo desta espécie e de maneira semelhante ao observado em outros teleósteos estudados. Além disso, mudanças no perfil de concentração de hormônios plasmáticos refletem modificações na histologia testicular também, sugerindo suas implicações na regulação de eventos de espermatogênese em *S. hilarii*. Como os estudos que abordam o controle hormonal da reprodução em machos de peixes neotropicais são escassos e estudos focados na identificação dos efeitos fisiológicos e mecanismo de ação dos hormônios esteroide sexuais em *S. hilarii* são inexistentes, ações são necessárias para fornecer um conhecimento detalhado da fisiologia reprodutiva desta espécie e assim, ajudar a melhorar o manejo dessa espécie em cativeiro fornecendo dados para o programa de repovoamento dessa espécie na Bacia do Alto Rio Tietê e seus afluentes, pois *S. hilarii* apresenta vários problemas de disfunção reprodutiva quando mantidas cativeiro, principalmente as fêmeas.

Agradecimentos

O presente estudo foi financiado e teve auxílio técnico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (respectivamente, Processo nº2001/10483-1; Processo nº2017/06765-0). Agradecemos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Bolsa de Mestrado Processo nº134451/2005-8). Os autores agradecem os pescadores artesanais que coletaram os animais em seu ambiente natural.

Referências

Amaral JS, Melo RG, Honji RM, Moreira RG. 2007. Effects of migration impediment of *Salminus hilarii* (Teleostei: Characidae) on the pituitary-gonads axis. In: Seventh International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Salvador, BA, 148A: s44p. Doi: 10.1016/j.cbpa.2007.06.111.

Andrade DR, Godinho AL, Godinho HP, Shimoda E. 2006. Biologia reprodutiva da tabarana, *Salminus hilarii* (Osteichthyes, Characidae) na represa de três Marias, MG. Rev. Bras. Med. Vet. 28(1): 26-32. Doi: 10.4322/rbcv.2014.359.

Baldisserotto B, Gomes LC. 2005. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria, Rio Grande do Sul, 1Ed. UFSM. 470p.

Behmer AO, Tolosa EMC, Neto AGF. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART. São Paulo. Livraria Editora Ltda. 239p.

Birba A, Ramallo MR, Lo Nostro FL, Moreira RG, Pandolfi M. 2015. Reproductive and parental care physiology of Cichlasoma dimerus males. Gen. Comp. Endocrinol. 221: 193-200. Doi: 10.1016/j.ygcen.2015.02.004.

Camargo C. 2007. Efeitos do bloqueio da migração reprodutiva nas reservas metabólicas da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). Dissertação. Universidade de Mogi das Cruzes. 65p.

Godoy MP. 1975. Peixes do Brasil – Sub-ordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi-Guaçu, Piracicaba. Editora: Franciscana. 4vol. 398p.

Grier HJ. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli barrier. In: Russel LD, Griswald MD (eds) The Sertoli Cell. Clearwater: Cache River Press. p703-739.

Honji RM, Mello PH, Araújo BC, Rodrigues-Filho JA, Hilsdorf AW, Moreira RG. 2011a. Influence of spawning procedure in fertilization success in *Salminus hilarii*

Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): Implications for conservation this species. Neotropic. Ichthyol. 9: 363-370. Doi: 10.1590/S1679-62252011005000012.

Honji RM, Narcizo AM, Borella MI, Romagosa E, Moreira RG. 2009. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). Fish Physiol. Biochem. 35: 109-123. Doi: 10.1007/s10695-008-9239-9.

Honji RM, Caneppele D, Pandolfi M, Lo Nostro FL, Moreira RG. 2011b. The brain-pituitary axis structure in captivity reared females of Steindachneridion parahybae (Siluriformes). In: 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Cochin, India. 4: 30-31.

Honji RM, Nóbrega RH, Pandolfi M, Shimizu A, Borella MI, Moreira RG. 2013. Immunohistochemical study of pituitary cells in wild and captive *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) females during the annual reproductive cycle. SpringerPlus. 2: 460-474. Doi: 10.1186/2193-1801-2-460.

Lange IG, Hartel A, Meyer HHD. 2003. Evolution of oestrogen functions in vertebrates. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 83: 219-226. Doi: 10.1016/S0960--0760(02)00225-X.

Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mañanós EL, Gómez A, Lareyre JJ. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. Gen. Comp. Endocrinol. 165: 412-437. Doi: 10.1016/j.ygcen.2009.07.019.

Lima FCT, Britski HA. 2007. Salminus franscisanus, a new species from the Rio São Francisco Basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Neotrop. Ichthyol. 5(3): 237-244. Doi: 10.1590/S1679-62252007000300001.

Marceniuk PA, Hilsdorf AWS. 2010. Peixes das cabeceiras do rio Tietê e Parque das Neblinas. 1. ed. Bauru: Canal 6. 157p.

Mennuet A, Adrio F, Kah O, Pakdel F. 2005. Regulation and function of estrogen receptors: comparative aspects. In: Melamed P, Sherwood N (eds) Hormones and their receptors in fish reproduction. Molecular aspects of fish and marine biology. vol 4. World Scientific. p.224-253.

Moreira RG, Honji RM, Melo RG, Narcizo AM, Amaral JS, Araújo RC, Hilsdorf AWS. 2015. The involvement of gonadotropins and gonadal steroids in the ovulatory dysfunction of the potamodromous *Salminus hilarii* (Teleostei: Characidae) in captivity. Fish Physiol. Biochem. 41(6): 1435-1447. Doi: 10.1007/s10695-015-0097-y.

Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. 165: 516-534. Doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.007.

Parenti LR, Grier HJ. 2004. Evolution and phylogeny of gonadal morphology in bony fishes. Int. Comp. Biol. 44: 333-348. Doi: 10.1093/icb/44.5.333.

Porto-Foresti F, Castilho-Almeida RB, Foresti F. 2005. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (Astyanax altiparanae). In: Baldisserotto B, Gomes LC. (Org). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 1Editora UFSM. Santa Maria. p.105-120.

São Paulo. 2008. Decreto Estadual nº 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118 (187) Secretaria do Meio Ambiente.

Sato Y, Fenerich-Verani N, Nuñer APO, Godinho HP, Verani JR. 2003. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho HP, Godinho AL. (Org). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte. PUC-Minas. p.229-274.

Schulz RW, França LR, Lareyre J, LeGac F, Chiarini--Garcia H, Nóbrega RH, Miura T. 2010. Spermatogenesis in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 165: 390-411. Doi: 10.1016/j.ygcen.2009.02.013.

Silva FSD, Deus JRM, Hilsdorf AWS. 2006. The upper reached ichthyofauna of the Tietê River, São Paulo, Brazil: aspects of their diversity and conservation. Biodivers. Conserv. 15: 3569-3577. Doi: 10.1007/s10531-004-1460-y.

Sink TD, Lockmann RT, Fecteau KA. 2008. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. Fish Physiol. Biochem. 34: 95–101. Doi: 10.1007/s10695-007-9150-9.

Takahashi ELH. 2006. Ciclo reprodutivo da tabarana *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (Characidae, Salmininae) na região do baixo Rio Sorocaba, SP. Dissertação. Universidade Estadual Paulista. Centro de Aquicultura. Jaboticabal. 58p.

Tubbs C, Thomas P. 2008. Functional characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) subtypes: a review with new data showing mPRalpha expression in seatrout sperm and its association with sperm motility. Steroids. 73: 935–941. Doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.022.

Vazzoler AEAM. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. EDUEM, Maringá. 169p.

Villares-Junior GA, Goiten R. 2015. Variations of *Salminus hilarii* diet (Ostariophysi, Characidae): seasonal and ontogenetic effects. Braz. J. Biol. 75: 574-580. Doi: 10.1590/1519-6984.17213.

Villares-Junior GA, Goiten R. 2016. Morphological aspects in the ontogeny of *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Ostaryophysi: Characidae). Braz. J. Biol. 76: 905-911. Doi: 10.1590/1519-6984.04315.

Villares-Junior GA, Gomiero LM, Goiten R. 2007. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Salminus hilarii* Valenciennes 1850 (Osteichthyes, Characidae) em um trecho da Bacia do Rio Sorocaba, Estado de São Paulo, Brasil. Acta Sci. Biol. Sci 29(4): 407-412. Doi: 10.4025/actascibiolsci.v29i4.884.

von Ihering R. 1929. Da vida dos peixes. Ensaios e scenas de pescarias. Companhia Melhoramentos de São Paulo. Editora Proprietária, 150p.

Weingartner M, Zaniboni-Filho E. 2005. Dourado. In: Baldiserotto B, Gomes LC. (Org). Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Editora UFSM. Santa Maria. p.257-281.

Young G, Kusakabe M, Nakamura I. 2005. Gonadal steroidogenesis in teleost fish. In: Melamed P, Sherwood N. (eds). Hormones and their receptors in fish reproduc-

tion. Molecular aspects of fish and marine biology. vol 4. World Scientific. p.155-233.

Yueh WS, Chang CF. 1997. 17α,20β,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one and 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one stimulated spermiation in protandrous black porgy, Acanthopagrus schlegeli. Fish Physiol. Biochem. 17: 187–193. Doi: 10.1023/A:100777462.

Zohar Y, Muñoz-Cueto J, Elizur A, Kah O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 165: 438-455. Doi: 10.1016/j.ygcen.2009.04.017.