



Revista da

# Biologia

Volume 19  
Ano 2019

[ib.usp.br/revista](http://ib.usp.br/revista)



USP



## Revista da Biologia

Publica textos de todas as áreas da Biologia, abordando questões gerais (ensaios, revisões e comentários) e específicas (artigos experimentais originais, descrição de técnicas e resumos expandidos).

Há espaço também para perspectivas pessoais sobre questões biológicas com relevância social e política (opinião).

A Revista da Biologia é gratuita e exclusivamente on-line. Sua reprodução é permitida para fins não comerciais.

**ISSN1984-5154**

**[www.ib.usp.br/revista](http://www.ib.usp.br/revista)**

## Contato

[revistadabiologia@gmail.com](mailto:revistadabiologia@gmail.com)

### Revista da Biologia

Rua do Matão, trav. 14, 321  
Cidade Universitária, São Paulo  
São Paulo, SP Brasil  
CEP 05508-090

## Volume 19(1)

Publicado em maio de 2020



## Expediente do volume

### Editor Executivo

Marcos Buckeridge

### Editores

Ana Bottallo de Aguiar Quadros

Bruno Edson Chaves

Fabiann Lucena da Ponte

Felipe Tsuzuki

Henrique Rodrigues Vieira

Juliana Sobral de Barros

Karen dos Santos Toledo

Laila Asth

Rachel Montesinos

### Editores gráficos

Ana Bottallo de Aguiar Quadros

Karen dos Santos Toledo

Rachel Montesinos

### Consultores científicos

Anônimos

**Ilustração da capa:** *Amphisbaena alba*. Fotografada no município de Mariana (MG) em 25 de janeiro de 2018. Por Henrique C. Costa.

# Volume 19(1)

## Índice

- Estrutura e distribuição espacial de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Leguminosae Papilionoideae) em um fragmento de Floresta Atlântica, Bahia, Brasil** 1  
Structure and spatial distribution of *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Leguminosae – Papilionoideae) in a fragment of Atlantic Forest, Bahia, Brazil  
*Jamerson Souza da Costa, Luciene Cristina Lima e Lima & Ianara Rita Souza da Costa*
- Relógio Alimentar: Mecanismos da Sincronização Circadiana por Alimento** 7  
Food Clock: Mechanisms of Circadian Food Entrainment  
*Breno Tercio Santos Carneiro, Mario André Leocadio-Miguel & John Fontenele-Araujo*
- Quem são as Ansbênias?** 19  
Who are the Amphisbaenians?  
*Henrique C. Costa & Paulo C. A. Garcia*
- Dinâmica da maturação testicular durante o ciclo reprodutivo de *Salminus hilarii* (Teleostei, Characidae) em ambiente natural** 31  
Dynamics of testicular maturation during the reproductive cycle of *Salminus hilarii* (Teleostei, Characidae) in a natural habitat  
*Renato Massaaki Honji, Juliane Suzuki Amaral, Maria Inês Borella, Sérgio Ricardo Batlouni & Renata Guimarães Moreira*

# Estrutura e distribuição espacial de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Leguminosae – Papilionoideae) em um fragmento de Floresta Atlântica, Bahia, Brasil

Structure and spatial distribution of *Bowdichia virgilioides* Kunth.

(Leguminosae – Papilionoideae) in a fragment of Atlantic Forest, Bahia, Brazil

Jamerson Souza da Costa<sup>1\*</sup>, Luciene Cristina Lima e Lima<sup>1</sup>, Ianara Rita Souza da Costa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Rodovia Alagoinhas, BR-110, Km 03, Alagoinhas, Bahia, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Ciências Florestais, Avenida Marechal Rondon, s/n°, Rosa Elze, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

\*Contato: jamersonjsc@yahoo.com.br

**Resumo.** Uma população de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Leguminosae – Papilionoideae) foi estudada em um fragmento de Floresta Atlântica, no município de Alagoinhas (Bahia), objetivando determinar sua estrutura e o padrão de distribuição espacial. Foi demarcada uma área de 2.000 m<sup>2</sup>, em parcelas contíguas, estimando-se a altura e a circunferência à altura do peito (CAP) dos indivíduos. Totalizou-se 168 indivíduos amostrados, de plântulas a adultos. A distribuição dos indivíduos em classes de altura e circunferência revelou uma população em crescimento, apresentando o J-invertido para as classes de circunferência. A Razão Variância/Média (R) e o Índice de Morisita (IM) indicaram agregação da população estudada, podendo resultar da concentração dos recursos ambientais disponíveis, como luminosidade, e da limitação no processo de dispersão dos indivíduos da população.

**Palavras-chave.** Conservação; arranjo populacional; leguminosas; ecologia vegetal.

**Abstract.** We studied a population of *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Leguminosae – Papilionoideae) in a fragment of Atlantic Forest in the municipality of Alagoinhas, Bahia, aiming to determine its structure and the spatial distribution pattern. We defined an area of 2,000 m<sup>2</sup> in contiguous plots, and we estimated their height and also its circumference at breast height. We recorded 168 individuals, seedlings to adults. The distribution of individuals in height and circumference classes revealed a growing population, with the J- inverted to the circumference of classes. The Variance/Average Ratio (R) and the Morisita Index (IM) reported aggregation of the studied population, which may result from the concentration of the available environmental resources, such as luminosity, and from the limitation in the dispersion process.

**Keywords.** Conservation; distribution pattern; legumes; plant ecology.

## Introdução

Padrão espacial em vegetação é o arranjo de indivíduos pertencentes à determinada espécie ou população em uma área ou habitat específico. Matteucci e Colma (1982) definem padrão espacial como a descrição quantitativa da distribuição horizontal de indivíduos de uma espécie dentro de uma comunidade vegetal. Afirma-se, ainda, que padrão é o desvio da aleatoriedade do arranjo espacial o qual pode ter uma tendência ao arranjo uniforme ou ao arranjo agrupado (Diggle, 2003).

O estudo do padrão espacial de espécies arbóreas é uma ferramenta essencial para o conhecimento da eco-

logia florestal e ajuda a elucidar como se dá o aproveitamento dos recursos disponíveis por determinada espécie e sua função no sucesso do estabelecimento e reprodução (Condit *et al.*, 2000). Também é utilizado para estabelecer diferenças entre impactos antrópicos e processos dinâmicos naturais (Souza e Silva, 2006).

Os indivíduos de uma determinada população podem estar espacialmente distribuídos de forma aleatória, agregada ou uniforme. A distribuição uniforme é raramente observada, sendo a agregação o padrão mais comum (Brower e Zar, 1984). De acordo com Odum e Barret (2008), ambientes homogêneos apresentam condições

Recebido: 26jun2016

Aceito: 08fev2019

Publicado:

29mar2019

Editado por Ana

Bottallo de Aguiar

Quadros e revisado

por Anônimo

semelhantes de ocupação em qualquer ponto do habitat, o que permite o estabelecimento aleatório dos indivíduos. Quando há severa competição entre os indivíduos, esses se apresentam uniformemente espaçados. A distribuição agregada pode estar relacionada à concentração de recursos numa determinada área, ausência de dispersores ou à própria estratégia de dispersão de propágulos da espécie, como a autocoria, por exemplo.

Para as florestas tropicais, a própria diversidade e organização das comunidades vegetais podem ser discutidas a partir de dados populacionais (Janzen, 1970). Segundo Harper (1977), informações sobre a capacidade de regeneração ou sobre a ocorrência de perturbações anteriores também podem ser obtidas a partir da distribuição de idades e tamanho dos indivíduos de uma população. A distribuição de frequências de diâmetro pode evidenciar alterações no número de indivíduos nos estádios juvenil e/ou adulto como reflexo de uma perturbação recente, quando há um grande número de indivíduos nos estádios iniciais, ou de uma floresta madura, em que os indivíduos se apresentam em maior concentração nos estádios mais avançados (Dillenburg *et al.*, 1992; Martins, 1993; Dornelles e Negrelle, 2000). Mesmo a escolha de áreas para conservação de espécies de interesse deve levar em consideração a caracterização do seu padrão espacial para a definição do tamanho adequado da população a ser conservada (Capretz, 2004).

No presente estudo, foi analisada uma população de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Leguminosae – Papilionoideae) em uma área de Floresta Ombrófila Densa Submontana, remanescente de Floresta Atlântica, localizado no Campus II da Universidade do Estado da Bahia – UNEB. A escolha de *Bowdichia virgilioides* deu-se devido à sua classificação como espécie pioneira, nativa da América do Sul (ILDIS, 2005), com ampla distribuição no Brasil (CARDOSO, 2018), e por ser considerada uma das espécies características de remanescentes de Floresta Atlântica (Pereira e Alves, 2006). Além disso, *B. virgilioides* apresenta potencialidades econômicas, com destaque para os campos: paisagístico, na arborização de vias; medicinal, com propriedades anti-inflamatórias; madeireiro, utilizada na construção de casas e acabamentos internos; e na recuperação de áreas degradadas (Smiderle e Souza, 2003; Silva Júnior, 2005; Lorenzi, 2008; Thomazzi *et al.*, 2010).

*Bowdichia virgilioides*, conhecida popularmente como sucupira-preta, dentre outras denominações (Souza *et al.*, 2003), é uma árvore de casca suberosa escura, fendilhada e com cristas irregulares, podendo atingir 16 metros de altura. Possui folhas alternas, as quais apresentam variações morfológicas; compostas, pinadas, com folíolos pubescentes, curto-peciolados. Suas flores papilionáceas, com simetria zigomorfa e prefloração imbricada, apresentam corola lilás e se dispõem em panículas terminais ou axilares, conferindo um aspecto ornamental e apícola à espécie. Os frutos são legumes planos, indeiscentes, castanho-avermelhados, com cerca de 5cm de comprimento, contendo pequenas sementes de 3 a 5mm de comprimento (Polhill e Raven, 1981; Lorenzi, 1992, Souza *et al.*, 2003;

Lewis *et al.*, 2005), as quais apresentam baixo percentual de germinação (Silva Júnior, 2005).

A espécie *B. virgilioides* vem sofrendo redução sensível no número de indivíduos, devido à exploração desordenada de remanescentes florestais (CNCFlora, 2012) e, de acordo com Silva Júnior (2005) e Lorenzi (2008), pela ocorrência de dormência tegumentar em suas sementes, que apresentam baixa porcentagem de germinação. Nesse contexto, este trabalho objetivou determinar o padrão de distribuição espacial de indivíduos da espécie *B. virgilioides*, em uma área remanescente de Floresta Atlântica, localizada no campus da UNEB, na cidade de Alagoinhas-BA, caracterizando sua estrutura populacional em classes de altura e circunferência.

## Métodos

A área de estudo, com aproximadamente 50 ha., está inserida no domínio da Floresta Ombrófila Densa Submontana (Veloso *et al.*, 1991), localizada no Campus II da Universidade do Estado da Bahia – UNEB, no município baiano de Alagoinhas, cuja sede encontra-se sob as coordenadas 12°08'S e 38°26'W, a 132 m de altitude. O remanescente estudado forma um mosaico vegetacional em diferentes etapas de desenvolvimento, com comunidades em estágios: a) *inicial*, cuja altura média é de até 5m, com espécies lenhosas com distribuição de diâmetro de baixa amplitude (DAP médio até 8cm), baixa diversidade de epífitas, serrapilheira inexistente ou fina e pouco decomposta e poucas espécies arbóreas ou arborescentes; b) *médio*, apresentando fisionomia predominantemente arbóreo-arbustiva, com altura média variando de 5 a 15m, DAP médio de até 15cm, maior número e diversidade de epífitas (em relação ao estágio inicial), trepadeiras lenhosas, serrapilheira e sub-bosque presentes e significativa diversidade biológica; e c) *avançado de regeneração*, com fisionomia arbórea, formando dossel fechado e altura média superior a 15m, distribuição diamétrica de grande amplitude (DAP > 15cm), epífitas em grande número de espécies e abundância, trepadeiras lenhosas, serrapilheira abundante, grande diversidade biológica e complexidade estrutural (CONAMA, 1994).

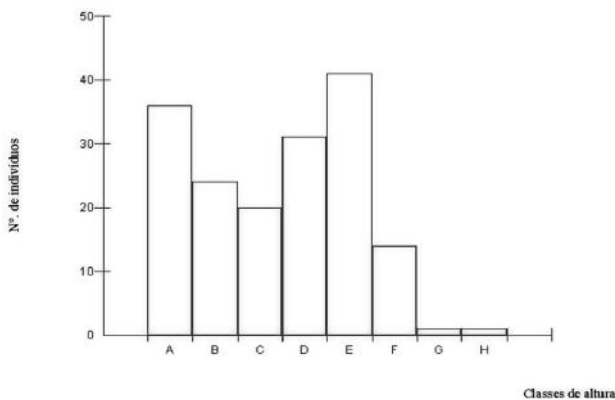
O trecho analisado é uma fisionomia florestal estratificada, praticamente com dossel contínuo em toda a sua extensão, com indivíduos do estrato superior atingindo até 16m, representados principalmente pelas espécies *Tapirira guianensis* Aubl., *Stryphnodendron pulcherimum* (Willd.) Hochr., *Ocotea gardneri* (Miers) Nees., *Bowdichia virgilioides*, *Himatanthus bracteatus* (A.DC.) Woodson. e *Byrsonima sericea* DC. No sub-bosque sombreado, predominam arbustos e arvoretas, das famílias Asteraceae, Myrtaceae e Melastomataceae. O chão florestal é formado essencialmente por plântulas das matrizes arbóreas e com serrapilheira homoganeamente distribuída.

O clima varia de úmido a sub-úmido (C2d'A), segundo a classificação de Thornthwaite (SEI, 2007), com temperatura média anual de 24,2 °C, pluviosidade anual média de 1.469mm e com período de maior precipitação entre os meses de abril e junho (CEI, 1994). Os solos classificados na área de distribuição do remanescente são do

tipo Podzólico Acinzentado, Litólico, Areia quartzosa e Glei Pouco Húmico (IGEO/UFBA, 1999), predominantemente ácidos, contendo detritos de canga, areias e argilas de decomposição dos sedimentos cretáceos e da formação Barreiras, de baixa fertilidade, necessitando de adubação e correção da acidez trocável para o uso na agricultura (RADAMBRASIL, 1981).

Para a coleta dos dados foi utilizado o método de parcelas com mesmo tamanho e formato (Greig-Smith, 1964). O tamanho das parcelas varia com o porte da espécie estudada e com a distância entre os indivíduos na população, numa escala que permita responder à questão proposta. Dessa forma, não há um tamanho padrão de parcelas adequado para amostragem de indivíduos em estudos de distribuição espacial (Krebs, 1999). Para este estudo, devido ao porte arbóreo da espécie analisada, foram demarcadas 10 parcelas contíguas, medindo 20 x 10 m, totalizando 2.000m<sup>2</sup> de área amostrada. Para subsidiar o estudo da estrutura e distribuição da população, foi mensurada a altura de todos os indivíduos de *Bowdichia virgilioides* contidos nas parcelas, desde plântulas até indivíduos adultos. Aqueles indivíduos com altura superior a 1,3m tiveram, ainda, a circunferência à altura do peito (CAP) registrada.

Com os dados amostrados, foram analisadas a densidade e a distribuição de frequências para classes de altura e circunferência. Foi calculada, ainda, a correlação entre altura e circunferência da população, no intuito de verificar se o crescimento em altura e circunferência se dá



**Figura 1.** Número de indivíduos de *B. virgilioides* por classes de altura. Classes: A (0,15–1,65m), B (1,65–3,15 m), C (3,15–4,65m), D (4,65–6,15m), E (6,15–7,65m), F (7,65–9,15m), G (9,15–10,65m), H (10,65–12,15m).

proporcionalmente ou se o investimento em crescimento está direcionado a apenas um sentido. A significância estatística do valor obtido foi verificada a partir do teste t (Centeno, 1999).

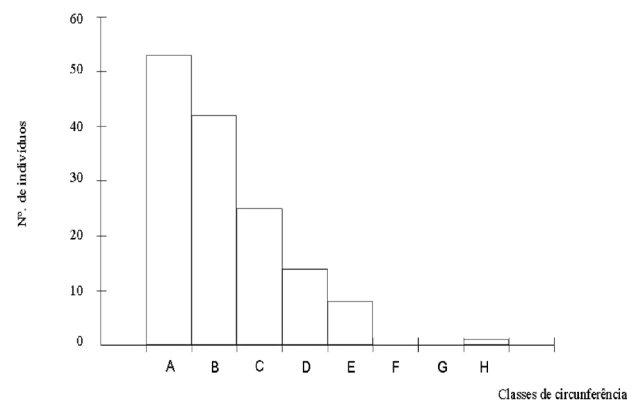
O padrão de distribuição espacial foi analisado pela Razão variância/média (R) (Dajoz, 2006) e pelo Índice de Morisita (IM) (Silveira Neto *et al.*, 1976), onde os valores de IM e R menores que 1,0 indicam distribuição regular ou sem agrupamento, valores iguais a 1,0 indicam distribuição ao acaso e para valores maiores que 1,0, a distribuição é contagiana ou agregada. A razão entre a vari-

ância e a média tem sido referida na literatura como coeficiente de dispersão ou variância relativa, sendo a mais antiga e a mais simples medida de dispersão, embora seja criticado pelo fato de que certos padrões não aleatórios podem, também, produzir uma razão variância/média igual a 1. Nesses casos, outros métodos devem ser empregados. O Índice de Morisita é tido por Krebs (1999) como o melhor índice, por ser independente da densidade populacional e do tamanho da amostra. Brower e Zar (1984) corroboram com esse entendimento, afirmando que R pode ser influenciado pelo tamanho da população e das parcelas, enquanto o IM não apresenta esta característica, de modo que não é afetado pela exclusão aleatória de membros da população.

A razão R calculada foi  $R = S^2/m$  e o Índice de Morisita  $IM = N\sum x^2 - \sum x / (\sum x)^2 - \sum x$ , onde N corresponde ao total de amostras, e  $\sum x$  = somatório dos números de indivíduos encontrados nas amostras. Valores menores que 1 indicam distribuição regular ou sem agrupamento, valores iguais a 1 indicam distribuição ao acaso e os valores maiores que 1 apontam para uma distribuição contagiana ou agregada. A significância do valor calculado de R foi obtida pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (Budke *et al.*, 2004). A significância estatística para o Índice de Morisita foi constatada pelo valor de F para significância a 5% de probabilidade (Silveira Neto *et al.*, 1976). As análises foram realizadas com auxílio do programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

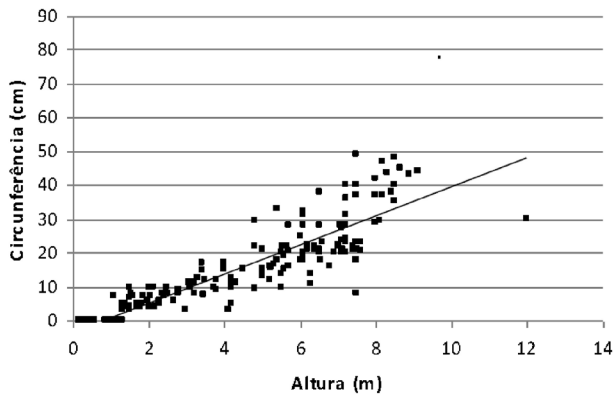
## Resultados

Foram registrados 168 indivíduos de *Bowdichia virgilioides* nos 2.000m<sup>2</sup> de área estudada, o que representa uma densidade de 0,084 indivíduos/m<sup>2</sup> ou 840 indivíduos. ha<sup>-1</sup>, sendo encontrados no mínimo um e no máximo 40 indivíduos por parcela. O indivíduo de menor altura estudado media 0,15m e o de maior altura 12m. A altura mé-



**Figura 2.** Número de indivíduos de *B. virgilioides* por classes de circunferência. Classes: A (3,00–12,33cm), B (12,33–21,65cm), C (21,65–30,98cm), D (30,98–40,30cm), E (40,30–49,63cm), F (49,63–58,95cm), G (58,95–66,28cm), H (66,28–77,60cm).





**Figura 3.** Valores de circunferência em função das alturas para a população de *B. virgilioides* estudada. Correlação de  $r = 0,86$  ( $p < 0,001$ ;  $R^2 = 0,74$ ).

dia dos indivíduos foi de 4,52m, e a circunferência média foi de 18,98cm (E.P.  $\pm$  2,71), com menor circunferência amostrada de 3cm e 77,5cm como o maior valor registrado.

A distribuição de frequência por classes de altura, embora não se assemelhe ao J-invertido típico, mostra uma concentração dos indivíduos nas classes de altura inferiores a 7,0m, especialmente nas classes A e E, com 80 indivíduos (46,62%) apresentando até 4,65m; 86 (51,18%) com alturas entre 4,65m e 9,15m; e apenas 2 (1,20%) com altura superior a 9,15m (Figura 1). Para a distribuição em classes de circunferência, a população tende ao J-invertido típico. Os indivíduos com CAP de até 30,98cm totalizaram 120, o que corresponde a 83,91%; 22 (15,39%) apresentam CAP entre 30,98cm e 49,63cm; e apenas um indivíduo (0,7%) possui CAP  $>$  49,63cm (Figura 2). Não houve representantes das classes de circunferência entre 49,63cm e 68,28cm. O coeficiente de correlação entre a altura e a circunferência foi de 0,86 (Figura 3), indicando que essas duas variáveis estão altamente associadas ( $t = 22,19$ ;  $p < 0,001$ ).

A população de *Bowdichia virgilioides* estudada apresentou padrão de distribuição agregado tanto pela Razão Variância/Média quanto pelo Índice de Morisita (Tabela 1). A significância estatística foi constatada por meio dos valores do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para a Razão Variância/Média e pelo teste F para o segundo índice, com valores maiores do que os tabelados, para ambos, conforme registrado na Tabela 1.

## Discussão

Nos histogramas de frequência, cada classe de diâmetros representa uma etapa do processo de regeneração populacional de uma espécie (Rollet, 1978). A frequência diminui na medida em que aumentam as classes de diâmetro, sendo maior nas classes diamétricas mais baixas, assinalando uma curva do tipo exponencial denominada J-invertido (Scolforo *et al.*, 1998). No presente caso, os dados indicam uma população em crescimento e autorregenerativa (Whitmore, 1975), com possível ocorrência

de interrupção no recrutamento e reprodução da espécie, que podem ser afetados por fatores como herbivoria, patógenos, competição entre plântulas e taxa de germinação (Swaine *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 1989; Howe, 1990; Cruz *et al.*, 2012). As sementes de *Bowdichia virgilioides* apresentam dormência tegumentar, ou seja, não germinam mesmo quando expostas às condições ideais para a espécie, exibindo baixa taxa de germinação (Almeida, 2012), o que explica os resultados obtidos. O mesmo padrão J-invertido foi também descrito por Antonini e Nunes-Freitas (2004) para uma população de *Miconia prasina* D.C., em duas áreas de Floresta Atlântica, no Rio de Janeiro; por Almeida e Cortines (2008) para *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr., na vertente Atlântica da Serra do Mar, também no estado do Rio de Janeiro; para Florestas de Galeria no Brasil Central (Silva Júnior, 2004); Cerrado (Oliveira *et al.*, 1989); e no Pantanal mato-grossense (Marimon e Lima, 2001).

A correlação positiva entre altura e circunferência indica que os indivíduos se encontram em crescimento, investindo tanto no crescimento do tronco quanto no aumento do seu calibre. Por se tratar de uma área com dossel contínuo e de baixa luminosidade nos estratos inferiores e sendo *Bowdichia virgilioides* uma espécie pioneira (ILDIS, 2005), o crescimento em altura possivelmente está relacionado à busca por maior luminosidade, enquanto o aumento do tronco se dá para suportar as estruturas em desenvolvimento.

O padrão de distribuição agregado de *B. virgilioides*, reportado por ambos os índices, pode estar relacionado à heterogeneidade do ambiente em sua disponibilidade de recursos, existindo concentração dos indivíduos naquelas áreas onde os recursos são mais favoráveis (Resende *et al.*, 2003). O ambiente é estruturado por várias formas de produção de energia, havendo, dessa forma, disponibilização irregular dos recursos, o que gera padrões espaciais distantes da uniformidade e/ou aleatoriedade (Legendre e Fortin, 1989; Hutchings, 1997). Características como a conformação do dossel e profundidade da serrapilheira criam gradientes luminosos no chão florestal que, conseqüentemente, afetam a germinação das sementes ali depositadas (Montgomery e Chazdon, 2001; Harms *et al.*, 2004). Logo, considerando que na área estudada o dossel é contínuo em praticamente toda sua extensão, a existência de manchas de luz no piso da floresta pode resultar na distribuição agregada dos indivíduos de *Bowdichia virgilioides*, espécie pioneira, heliófita (Rizzini, 1990; Lorenzi, 2008), que exige maior disponibilidade de luz. Dessa forma, a germinação das sementes e o estabelecimento de plântulas deve se dar, de forma concentrada, onde há maior luminosidade. Garcia e Sartori (2009) também reportaram agregação para *B. virgilioides* em um fragmento de Cerradão sul-mato-grossense.

O arranjo agregado, tal como observado na população estudada, pode estar relacionado, ainda, às limitações no processo de dispersão da espécie (Jones *et al.*, 2007), uma vez que o modo de disseminação das sementes acaba sendo o primeiro determinante do padrão espacial. Garcia e Sartori (2009) apontam *Bowdichia virgilioides*

**Tabela 1.** Distribuição espacial de *Bowdichia virgilioides* Kunth. em um fragmento de Floresta Atlântica, Bahia. R = Variância/Média; IM = Índice de Morisita; g.l. = graus de liberdade; F = teste F;  $\chi^2$  = Qui-quadrado; p = valor-p e a = significância.

Índices	Valores	Distribuição espacial	g.l.	F	$\chi^2$	p	a
R	8,82	Agregada	9	-	79,41	< 0,0001	0,05
IM	1,42	Agregada	9	8,70	-	< 0,0001	0,05

como uma espécie autocórica, ou seja, capaz de dispersar suas sementes sem o auxílio de agentes externos, mas que limita a distância de lançamento das sementes. Costa *et al.* (2004) e Figueiredo (2008), no entanto, indicam esta espécie como anemocórica, o que contrariaria os resultados, pois acredita-se que diásporos dispersados pelo vento tendem ao espalhamento aleatório, não resultando em agrupamentos (Negrini *et al.*, 2012). A mesma relação entre anemocoria e o padrão de distribuição agregado foi encontrado para *Qualea parviflora* Mart. em Goiás (Souza e Coimbra, 2005). Possivelmente, *Bowdichia virgilioides* não se apresenta como uma espécie estritamente autocórica nem estritamente anemocórica, mas capaz de realizar ambos os processos dispersivos. Sopesando a distribuição agregada da população estudada e, ainda, que a mesma está localizada no interior da floresta, o que dificulta a ação do vento na dispersão das sementes, os indivíduos analisados devem se utilizar de mecanismos próprios para a projeção de suas sementes.

A distribuição espacial de uma população depende do padrão de dispersão das sementes e da probabilidade de sobrevivência das plântulas (Janzen, 1970). Esta, por sua vez, pode ser afetada por fatores bióticos, dependentes da densidade, como predação ou por fatores independentes da densidade, bióticos ou abióticos, que constituem o mosaico de condições ambientais existentes na área (Hubbell, 1980). A agregação de *Bowdichia virgilioides* na área estudada pode resultar do mosaico formado pelas manchas de luz no chão florestal, que garantem as condições de luminosidade necessárias à germinação das sementes e ao desenvolvimento das plântulas. Evolutivamente, os organismos distribuem-se agregadamente, quando e onde encontram condições que favoreçam sua reprodução e, consequentemente, sua sobrevivência (Legendre e Fortin, 1989; Hutchings, 1997; Begon *et al.*, 2006).

Em populações com padrão agregado, a chance de ocorrência de um indivíduo é aumentada pela presença de outros (atração) (Souza e Silva, 2006). Os fatores bióticos, como competição, biologia reprodutiva, fisiologia e herbivoria também influenciam o padrão espacial e a dinâmica das populações vegetais (Greig-Smith, 1964). Ainda, segundo a Teoria Neutra da Biodiversidade (Hubbell, 2001), a distribuição agregada pode ser gerada, simplesmente, por equivalência ecológica das espécies, morte

ao acaso de indivíduos e limitação da dispersão. Na área de estudo, o processo dispersivo de *Bowdichia virgilioides* pode ser limitado pela restrição da ação dos ventos, uma vez que se trata de interior florestal.

### Conclusão

Os resultados indicam que *Bowdichia virgilioides* apresenta, na área estudada, uma população em crescimento, auxiliando no processo de regeneração do fragmento, formando agregações na amostra de vegetação por ambos os índices empregados, tendendo a uma população mais concentrada em manchas de habitat favorável. Do mesmo modo, o lançamento de sementes em curtas distâncias possivelmente tem determinado o agrupamento dos indivíduos, ainda que sob influência de competição intraespecífica.

### Referências

- Almeida FS, Cortines E. 2008. Estrutura populacional e distribuição de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. Floresta e Ambiente, 15: 18-23.
- Almeida JO. 2012. Germinação e crescimento de mudas de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-MG.
- Antonini RD, Nunes-Freitas AF. 2004. Estrutura populacional e distribuição espacial de *Miconia prasina* D.C. (Melastomataceae) em duas áreas de Floresta Atlântica na Ilha Grande, RJ, Sudeste do Brasil. Acta Botânica Brasílica, 18: 671-676.
- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos A. 2007. BioStat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM; CNPq. 364 p.
- Begon M, Harper JL, Towhsend CR. 2006. Fundamentos em Ecologia. Porto Alegre: Artmed.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. 1994. Resolução n.º 28, de 07 de dezembro de 1994.



- Brower, JE, Zar JH. 1984. Field and laboratory methods for general ecology. Dubuque: Wm. C. Brown.
- Budke JC, Giehl ELH, Athayde EA, Eisinger SM, Záchia RA. 2004. Florística e fitossociologia do componente arbóreo de uma floresta ribeirinha, arroio Passo das Tropas, Santa Maria, RS, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, 18: 581-589.
- Capretz RL. 2004. Análise dos padrões espaciais de árvores em quatro formações florestais no Estado de São Paulo, através de análises de segunda ordem, como a função K de Ripley. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.
- Cardoso, DBOS. *Bowdichia* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29489>>. Acesso em: 19 Out. 2018
- CEI. Centro de Estatística e Informações – Bahia. 1994. Informações básicas dos municípios baianos: região Litoral Norte. Salvador.
- Centeno AJ. 1999. Curso de estatística aplicada à biologia. Goiânia: UFGO.
- CNCFlora. *Bowdichia virgilioides*. In Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Bowdichia virgilioides](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Bowdichia_virgilioides)> Acesso em 04 de dezembro de 2017.
- Condit R, Ashton P, Baker P. 2000. Spatial patterns in the distribution of tropical tree species. *Science*, 288: 1414-1418.
- Costa IR, Araújo FS, Lima-Verde LW. 2004. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de Cerrado na Chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, 18: 759-770.
- Cruz AF, Passos MAA, Silva José AA, Torres SB, Oliveira IS. 2012. Métodos para análise de sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. *Scientia Forestalis*, 40: 77-84.
- Dajoz R. 2006. Princípios de ecologia. 7. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Diggle P. 2003. Spatial analysis of spatial point patterns. 2. ed. London: Oxford University Press Inc.
- Dillenburg LR, Waechter JL, Porto ML. 1992. Species composition and structure of a sandy coastal plain forest in northern Rio Grande do Sul, Brazil. In: Coastal plant communities of Latin America. San Diego: Academic Press, p. 349-366.
- Dorneles LPP, Negrelle, RRB. 2000. Aspectos da regeneração natural de espécies arbóreas da Floresta Atlântica. *Iheringia, Ser. Bot.*, 53: 85-100.
- Figueiredo PS. 2008. Fenologia e estratégias reprodutivas das espécies arbóreas em uma área marginal de cerrado, na transição para o semi-árido no nordeste do Maranhão, Brasil. *Revista Trópica*, 2: 8.
- Garcia AS, Sartori ALB. 2009. Síndromes de dispersão e distribuição espacial de leguminosas arbóreas do cerradão da RPPN da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. Apresentação oral, 60º Congresso Nacional de Botânica, Feira de Santana – BA.
- Greig-Smith MAP. 1964. Quantitative plant ecology. 2. ed. London: Buther Worths.
- Harms KE, Powers JS, Montgomery RA. 2004. Variation in small sampling density, understory cover and resource availability in four Neotropical forests. *Biotropica*, 36: p. 40-51.
- Harper JL. 1977. Population Biology of Plants. London: Academic Press.
- Howe, HF. 1990. Survival and growth of juvenile *Virola surinamensis* in Panama: effects of herbivory and canopy closure. *Journal of Tropical Ecology*, 6: 259-280.
- Hubbell SP. 1980. Seed predation and coexistence of tree species in tropical forests. *Oikos*, 35: 214-229.
- Hubbell SP. 2001. The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography. Vol. 32. Princeton University Press.
- Hutchings MJ. 1997. The structure of plant population. In: Crawley, MJ. (ed.). *Plant Ecology*. Oxford: Blackwell Scientific.
- IGEO/UFBA. 1999. Grupo de Pesquisa. Classificação Geomorfológica dos Solos do Campus II Alagoinhas, BA.
- ILDIS. 2005. International Legume Database and Information Science. Disponível em: <http://www.ildis.org>. Acesso em: 16 de janeiro de 2009.
- Janzen DH. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *America Nature*, 104: 501-526.
- Jones MM, Olivas Rojas P, Tuomisto H, Clark DB. 2007. Environmental and neighbourhood effects on tree ferns distributions in a neotropical lowland rain forest. *Journal of Vegetation Science*, 18: 13-24.
- Krebs CJ. 1999. *Ecological Methodology*. 2. ed. Menlo Park: Benjamim/Cummings.
- Legendre P, Fortin MJ. 1989. Spatial pattern and ecological analysis. *Vegetatio*, 80: 107-138.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M. 2005.

- Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, 577.
- Lorenzi H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum.
- Lorenzi H. 2008. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum.
- Marimon BS, Lima ES. 2001. Caracterização fitofisionômica e levantamento florístico preliminar no Pantanal dos Rios Montes-Araguaia, Cocalinho, Mato Grosso, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, 15: 213-229.
- Martins FR. 1993. Estrutura de uma floresta mesófila. 2. Ed. Campinas-SP: Unicamp.
- Matteucci WG, Colma A. 1982. Metodología para el estudio de la vegetación. Washington: OEA.
- Montgomery RA, Chazdon RL. 2001. Forest structure, canopy architecture and light transmittance in tropical wet forests. *Ecology*, 82: p. 2707-2718.
- Negrini M, Aguiar MD, Vieira CT, Silva AC, Higuchi P. 2012. Dispersão, distribuição espacial e estratificação vertical da comunidade arbórea em um fragmento florestal no Planalto Catarinense. *Revista Árvore*, 36 (5): 919-930.
- Odum EP, Barrett GW. 2008. Fundamentos de Ecologia. 5. ed. São Paulo: Cengage Learning.
- Oliveira PEAM, Ribeiro JF, Gonzales MI. 1989. Estrutura e distribuição espacial de uma população de *Kielmeyera coriacea* Mart. de cerrados de Brasília. *Revista Brasileira de Botânica*, 12: 39-47.
- Pereira MS, Alves RRN. 2006. Composição florística de um remanescente de Mata Atlântica na Área de Proteção Ambiental Barra do Rio Mamanguape, Paraíba, Brasil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 6: 357-366.
- Polhill RM, Raven PH. 1981. Advances in legume systematics. Royal Botanic Gardens, Kew.
- RADAMBRASIL. 1981. Levantamento de recursos naturais. Folha SD. 24 – Salvador; Geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro.
- Resende JCF, Klink CA, SCHIAVINI I. 2003. Spatial heterogeneity and its influence on *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 405-414.
- Rizzini CT. 1990. Árvores e madeiras úteis do Brasil. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher.
- Rollet B. 1978. Arquitetura e crescimento das florestas tropicais. Belem: SUDAM.
- Scolforo JRS, Pulz FA, Melo JM. 1998. Modelagem da produção, idade das florestas nativas, distribuição espacial das espécies e a análise estrutural. In: Scolforo JRS (org.). *Manejo Florestal*. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 189-246.
- SEI: Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. 2007. Tipologia climática – segundo Thornthwaite. Disponível em: [http://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/cartogramas/pdf/carto\\_tip\\_clim.pdf](http://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/cartogramas/pdf/carto_tip_clim.pdf). Acesso em: 11 de julho de 2010.
- Silva Júnior MC. 2004. Fitossociologia e estrutura diamétrica da mata de galeria do Taquara, na Reserva Ecológica do IBGE, DF. *Revista Árvore*, 28: 419-428.
- Silva Júnior MC. 2005. 100 árvores do Cerrado: guia de campo. Brasília, DF: Rede de Sementes do Cerrado.
- Silveira Neto S, Nakano O, Barbin D, Villa Nova NA. 1976. Manual de ecologia dos insetos. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda.
- Smiderle OJ, Sousa RCP. 2003. Dormência em sementes de paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth – FABACEAE – PAPILIONOIDEAE). *Revista Brasileira de Sementes*, 25: 72-75.
- Souza JS, Espirito Santo FDB, Fontes MAL. 2003. Análise das variações florísticas e estruturais da comunidade arbórea de um fragmento de floresta semidecídua às margens do rio Capivari, Lavras – MG. *Revista Árvore*, 27: 185-206.
- Souza JP, Coimbra FG. 2005. Estrutura populacional e distribuição espacial de *Qualea parviflora* Mart. em um Cerrado sensu stricto. *Bioscience Journal*, 21: 65-70.
- Souza VL, Silva OA. 2006. Estrutura e distribuição espacial de uma população de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville em Cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil. *Holos Environment*, 6: 55-69.
- Swaine MD, Lieberman D, Putz FE. 1987. The dynamics of tree population in tropical forest: a review. *Journal of Tropical Ecology*, 3: 359-366.
- Thomazzi SM, Silva CB, Silveira DC, Vasconcellos CL, Lira AF, Cambui EV, Estevam CS, Antonioli AR. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). *Journal of Ethnopharmacology*, 127: 451-456.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA. 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE.
- Whitmore TC. 1975. Tropical rain forest of the far east. Oxford: Clarendon Press.

# Relógio Alimentar: Mecanismos da Sincronização Circadiana por Alimento

## Food Clock: Mechanisms of Circadian Food Entrainment

**Breno Tercio Santos Carneiro<sup>1\*</sup>, Mario André Leocadio-Miguel<sup>1,2</sup>, John Fontenele-Araujo<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade Biológica, Departamento de Fisiologia e Comportamento, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

\*Contato: brenotscarneiro@gmail.com

**Resumo.** A ritmicidade é um aspecto fundamental da vida, com o ciclo dia-noite sendo a pista temporal (sincronizador) mais marcante na superfície terrestre. Animais também se sincronizam à disponibilidade de alimento, o que é caracterizado principalmente pela antecipação comportamental ao horário de alimentação. Em mamíferos, um oscilador circadiano independente do oscilador fótico (núcleo supraquiasmático) regula o comportamento antecipatório. Nos últimos anos, a identificação de órgãos periféricos e áreas do sistema nervoso central sincronizadas pelo horário de alimentação tem sugerido uma organização complexa do oscilador sincronizado por alimento (em Inglês, Food-Entrainable Oscillator – FEO), que possivelmente inclui múltiplos núcleos hipotalâmicos. Nesta revisão, apresentamos as principais características e propriedades da sincronização por alimento e discutimos potenciais mecanismos fisiológicos dentro da perspectiva de um sistema circadiano multioscilaratório.

**Palavras-chave.** Atividade antecipatória ao alimento (AAA); Oscilador sincronizado por alimento; Disponibilidade de alimento; Comportamento antecipatório.

Recebido: 22Out18  
Publicado: 05Abr19

Editado por Karen S. Toledo e revisado por Anônimo.

**Abstract.** Rhythmicity is a fundamental aspect of life, with the day-night cycle being the most striking temporal cue (synchronizer) on the earth's surface. Animals also synchronize to food availability, which is mainly characterized by behavioral anticipation of feeding time. In mammals, a circadian oscillator independent of the photic oscillator (suprachiasmatic nucleus) regulates the anticipatory behavior. In recent years, the identification of peripheral organs and areas of the central nervous system synchronized by feeding time has suggested a complex organization of the Food-Entrainable Oscillator (FEO), which possibly includes multiple hypothalamic nuclei. In this review, we present the main characteristics and properties of food entrainment and discuss potential physiological mechanisms within the perspective of a multi-oscillatory circadian system.

**Keywords.** Food-anticipatory activity (FAA); Food-Entrainable Oscillator (FEO); Food availability; Anticipatory behavior.

### SINCRONIZAÇÃO FÓTICA

O ciclo claro-escuro diário exerce um papel essencial para a vida na Terra, uma vez que a ritmicidade biológica está intimamente atrelada a ele (Flôres 2012). Diante de sua maior evidência, o estudo dos ritmos biológicos tem sido direcionado principalmente aos ritmos circadianos (do latim, circa= em torno, diem=dia). Uma questão fundamental nestes estudos tem sido a identificação do sistema interno gerador do ritmo, ou seja, o sistema oscilador capaz de criar alternância de estados. Assumindo que a sincronização ao ciclo claro-escuro necessita obrigatoriamente que a informação luminosa seja captada pelo organismo, estudos em mamíferos buscaram identificar as vias de transmissão da informação luminosa até o sistema nervoso central, especificamente o hipotálamo, a partir da hipótese de que esta região era responsável pelo controle circadiano das funções

fisiológicas (Sousa-Pinto e Castro-Correia, 1970). Utilizando injeções de traçadores neuronais no globo ocular de ratos, Moore e Lenn (1972), identificaram a região anterior do hipotálamo, precisamente o núcleo supraquiasmático (NSQ), como a região que recebia projeção das células da retina. Ao considerar que esta região não estaria envolvida no processamento de imagem, mas possivelmente na regulação circadiana das funções hipotalâmicas, Stephan e Zucker (1972) promoveram lesões desta área registrando a atividade locomotora e a ingestão de água em ratos. Os animais com lesão no NSQ perderam a ritmicidade circadiana destes dois comportamentos, indicando a função desta região na geração do ritmo circadiano.

O NSQ é atualmente reconhecido como o principal componente do sistema circadiano em mamíferos, uma vez que representa internamente o sinal temporal mais ób-



vio, o ciclo claro-escuro. No entanto, outros sinais temporais menos óbvios, como o horário de alimentação ou de administração de drogas também sincronizam o organismo, até mesmo de forma independente do NSQ (Verwey e Amir, 2009; Pezuk et al., 2010; Riede et al., 2017).

## SINCRONIZAÇÃO POR ALIMENTO

### *Aspectos Gerais*

Nos animais, a fisiologia e o comportamento do indivíduo estão intimamente relacionados à alternância entre dia e noite. Junto com o ciclo claro-escuro, outros sinais temporais compõem o conjunto de sincronizadores aos quais os seres vivos estão naturalmente expostos. Por exemplo, a alternância entre marés, com período de aproximadamente 12 h, é muito importante para a atividade de espécies marinhas (Naylor, 1996; Naylor e Williams, 1984), ao passo que o contato social é relevante para a sincronização em espécies que vivem em grupos (Mendes et al., 2008). Ciclos de disponibilidade de alimento também se constituem como um sincronizador para os ritmos circadianos, uma vez que diversas espécies ajustam seu comportamento e fisiologia aos horários de alimentação (Stephan, 2002; Carneiro e Araujo, 2012).

Os primeiros estudos que demonstraram a importância do horário de alimentação para os ritmos circadianos foram realizados na década de 1920, em abelhas e roedores. Ao estabelecer horário e local fixo para alimentação, Beling (1929) demonstrou que abelhas eram capazes de antecipar a disponibilidade de alimento em uma hora (Beling, 1929 apud Mistlberger, 1994). Em 1922, Curt Richter descreveu o padrão antecipatório do comportamento locomotor em ratos submetidos a um horário fixo de alimentação com duração de 25 minutos (Richter, 1922). Este incremento da atividade motora antes da alimentação se tornou conhecido posteriormente como atividade antecipatória ao alimento (em inglês Food-anticipatory activity, FAA) e, além de abelhas e ratos, é observada em outros roedores, em carnívoros, em peixes e em aves (Mistlberger, 1994; Ware et al., 2012; Nisembaum et al., 2014).

Em roedores, esse fenômeno tem sido estudado através da observação de diferentes comportamentos, tais como atividade locomotora geral, locomoção numa roda de atividade e atividade direcionada a um comedouro. Em estudos pioneiros, outras variáveis antecipatórias como a temperatura corporal e a liberação de corticosterona foram descritas (Krieger, 1974; Moberg et al., 1975). Além destas, descreveu-se também a sincronização do padrão de sono em ratos quando a disponibilidade de alimento é restrita a algumas horas por dia durante a fase de claro do ciclo claro-escuro. Nesta situação, o total de sono diminui, o tempo em vigília aumenta nas horas que antecedem a alimentação e o padrão de sono se inverte, com maior número de episódios de sono durante a fase de escuro (Gervais e Pager, 1979; Roky et al., 1999; Castro-faúndez et al., 2016). Isto indica que a ingestão de alimento num horário fixo pode alterar o funcionamento das regiões cerebrais responsáveis pela regulação do ciclo sono-vigília, desta maneira, sobrepondo-se ao controle temporal pelo claro-escuro. Modificações em todos esses ritmos permitem ao organismo estar comporta-

mental e fisiologicamente preparado quando o alimento se torna disponível.

### *Propriedades da Atividade Antecipatória ao Alimento*

Em geral, a atividade antecipatória ao alimento (AAA) em ratos pode ser observada entre o terceiro e décimo-quarto dia de restrição alimentar (Mistlberger, 1994). Diversos aspectos do comportamento de antecipação têm sido estudados nas últimas décadas, por exemplo: 1) limite circadiano; 2) resincronização com presença de dias transientes (reajuste gradual do ritmo) após mudança no horário da alimentação; e 3) persistência em condições constantes (privação total de alimento) (Mistlberger, 1994).

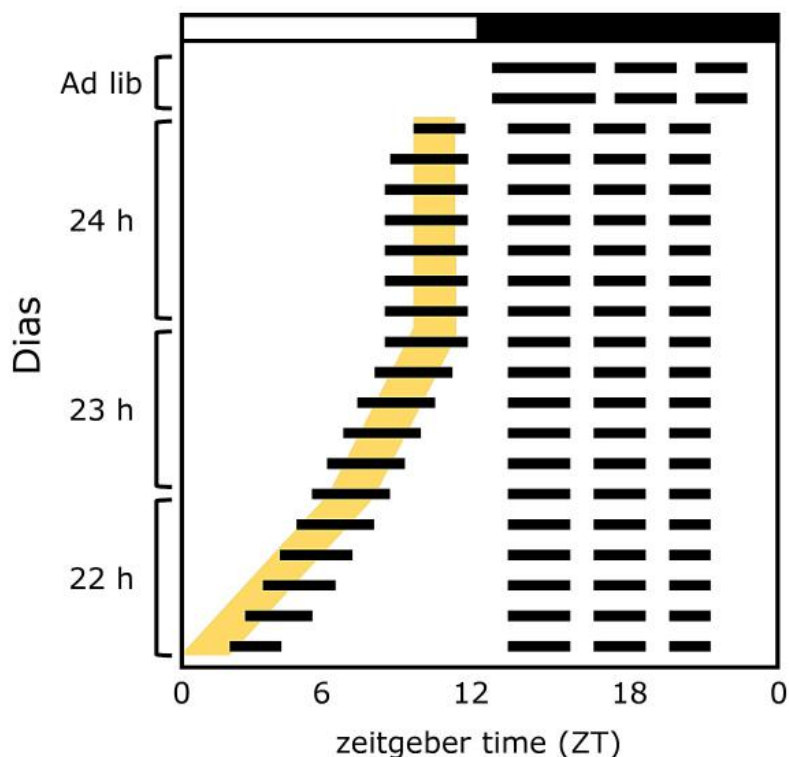
A atividade antecipatória ao alimento apresenta limites circadianos, ou seja, sua expressão é determinada pela periodicidade na qual o evento de alimentação se repete (Stephan, 1981; Mistlberger e Marchant, 1995). Estes autores mostraram que ratos são incapazes de antecipar horários de alimentação que se repetem com períodos menores que 23 ou maiores que 29 horas, o que indica o limite máximo de avanços e atrasos que o sistema sincronizado pela alimentação é capaz de promover, ou seja, sua natureza circadiana (figura 1). Este limite circadiano não se apresenta apenas comportamentalmente, mas também nos ritmos de expressão gênica dos osciladores presentes em órgãos periféricos (Hamaguchi et al., 2015).

O que ocorre com a atividade antecipatória de um animal quando mudamos bruscamente o seu horário de alimentação? Interessantemente, a atividade antecipatória demora alguns dias para se estabilizar, se arrastando até o novo padrão, através de um processo de ajuste progressivo diário (Stephan, 1984), o qual chamamos apropriadamente de arrastamento. O arrastamento é a propriedade do ritmo, inerente ao oscilador biológico, em que este sofre mudanças de fase (avanços ou atrasos), que promovem o ajuste gradual à pista ambiental cíclica presente (Flôres, 2012). Em outras palavras, a antecipação não é meramente uma resposta desencadeada pelo estímulo ambiental, é um comportamento rítmico gerado endogenamente (figura 2).

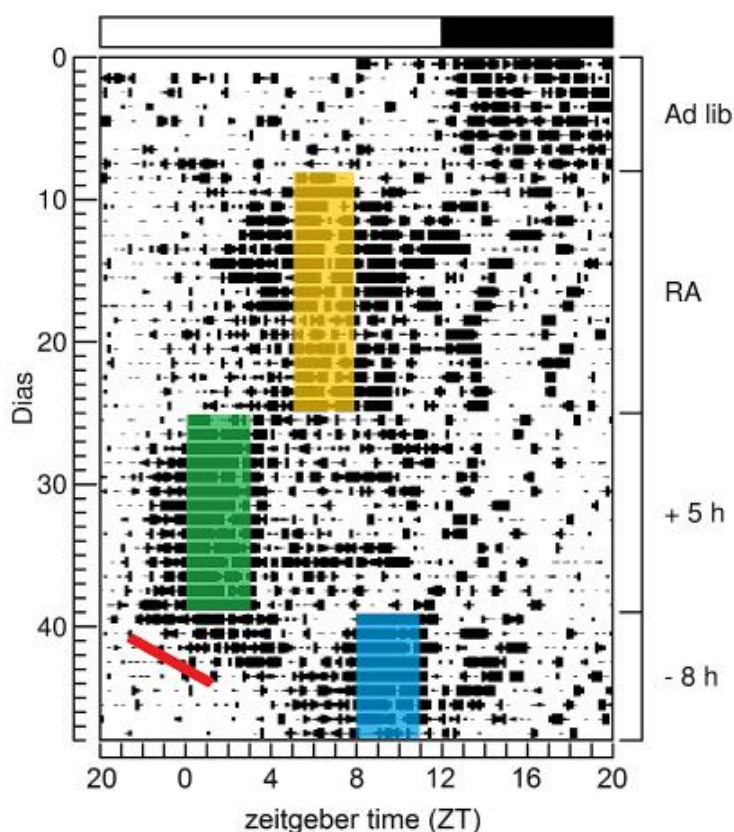
A persistência em condições temporais constantes (livre-curso) é outro aspecto importante da AAA (Coleman et al., 1982; Clarke e Coleman, 1986). Após sincronização ao horário de alimentação, estes pesquisadores submeteram ratos à privação total de alimento por três dias. Nesses dias, os animais mostraram aumento da atividade motora na mesma fase em que anteriormente exibiam atividade antecipatória ao horário de alimentação, o que indica a natureza oscilatória e autossustentada (caráter endógeno) subjacente ao processo de sincronização por alimento.

### *A Busca pelo Oscilador Sincronizado por Alimento*

Inicialmente, após o surgimento de evidências de que o NSQ, localizado na região anterior do hipotálamo, era essencial para a expressão de ritmos circadianos comportamentais e neuroendócrinos (Moore e Lenn, 1972; Stephan e Zucker, 1972), hipotetizou-se que essa estrutura também seria responsável pela antecipação comportamental à disponibilidade de alimento. No fim da década de 1970, o NSQ foi



**Figura 1.** Actograma esquemático de um rato submetido à restrição alimentar. A janela de alimentação corresponde à área em amarelo, durante a fase de claro. Com a alimentação à vontade (Ad lib), o animal apresenta atividade concentrada na fase de escuro. Em seguida, com alimentação a cada 24 horas, o animal apresenta atividade antecipatória estável entre o terceiro e o quarto dia de restrição alimentar. Com a alimentação oferecida a cada 23 horas, o animal mantém o comportamento antecipatório (sincronização). No entanto, quando o intervalo entre as refeições é encurtado para 22 horas, o animal perde a capacidade de sincronização, não antecipa a janela de alimentação. Ou seja, há um limite de sincronização (limite circadiano) para a ocorrência do comportamento antecipatório. Nota 1: as barras acima da figura indicam as fases de claro e escuro, cada uma correspondendo a 12 horas. Nota 2: zeitgeber (do Alemão, doador de tempo) time (ZT) se refere ao padrão internacional de indicação das horas do dia na condição de claro-escuro, no qual em um ciclo de claro:escuro de 12h:12h, ZT 0 corresponde ao início da fase de claro e ZT 12 ao início da fase de escuro.



**Figura 2.** Actograma de um rato submetido à restrição alimentar (RA) inicialmente em ZT 5 (amarelo). Após 18 dias, o horário de alimentação foi adiantado em cinco horas (+ 5 h), passando a ZT 0 (verde). O animal leva alguns dias para se readaptar, com a antecipação ressurgindo gradualmente. Após 14 dias, o horário foi atrasado em 8 horas (- 8 h), passando a ZT 8 (azul). Com esta mudança, é possível visualizar um componente de atividade se atrasando gradualmente em direção ao novo horário de alimentação.

alvo de estudos que tinham o objetivo de testar esta hipótese. Os resultados mostraram, entretanto, que ratos com lesão do NSQ mantinham sua capacidade de antecipar horários de alimentação (Phillips e Mikulka, 1979; Stephan et al., 1979). Este resultado foi posteriormente encontrado em camundongos e hamsters (Mistlberger, 1992; Marchant e Mistlberger, 1997). Em razão destes trabalhos, surgiu a ideia de que mamíferos possuem pelo menos dois sistemas independentes capazes de gerar ritmos circadianos, um sincronizado pela alternância de claro e escuro (Oscilador Sincronizado pela Luz, em inglês Light-Entrainable Oscillator – LEO), que tem como seu elemento central o NSQ, e outro sistema sincronizado por ciclos de disponibilidade de alimento (Oscilador Sincronizado por Alimento, em inglês Food-Entrainable Oscillator – FEO).

Da mesma forma que a busca pela estrutura física responsável pela geração do ritmo circadiano sincronizado ao ciclo claro-escuro dominou os estudos de sincronização fótica, a busca pelo oscilador sincronizado por alimento tem dominado o tema da sincronização por alimento. Os primeiros estudos partiram da hipótese de que tal oscilador deveria ter relação com o controle hipotalâmico da ingestão de alimento.

Em mamíferos, uma série de estudos de lesão na primeira metade do século XX levaram à proposição de que a ingestão de alimento seria regulada por um “centro da fome”, localizado no hipotálamo lateral e um “centro da saciedade”, localizado no hipotálamo ventromedial (Brobeck, 1946; Anand e Brobeck, 1951). Estudos posteriores, no entanto, demonstraram que o controle da ingestão de alimento requer a participação de diversas áreas no sistema nervoso central (Lutter e Nestler, 2009), em oposição à ideia predominante nos anos 1950 da existência destes centros. O hipotálamo ventromedial e lateral mantiveram suas posições como parte do sistema de regulação do comportamento alimentar, que atualmente incluem muitas outras áreas (King, 2006; Morton et al., 2006).

Diante deste cenário, o hipotálamo ventromedial e lateral foram testados quanto a suas possíveis funções na mediação da sincronização por alimento em ratos. Krieger (1980) mostrou que o ajuste da liberação de corticosterona e do ritmo de temperatura ao horário de alimentação é prejudicado em animais com lesão do hipotálamo ventromedial. Em seguida, Inouye (1982) relatou a extinção da atividade antecipatória ao alimento em animais com lesão desta área. Entretanto, Mistlberger e Rechtschaffen (1984) mostraram posteriormente que a atividade antecipatória em animais com lesão do hipotálamo ventromedial era extinta imediatamente após o procedimento cirúrgico, mas ressurgia depois de 14 semanas. Este resultado pode ser considerado uma indicação da existência de um mecanismo interno compensatório (ou reorganização) para a expressão do comportamento antecipatório. Trabalhos mais recentes apontam de forma direta para a participação do hipotálamo ventromedial neste comportamento, por exemplo, como um elemento envolvido no primeiro momento de adaptação a um horário restrito de alimentação (Ribeiro et al. 2007), ou como um mediador da ação da grelina (Merkestein et al., 2014), hormônio secretado principalmente pelo estômago que age como estimula-

dor da fome (Kim et al., 2014) e pode ter papel na regulação da atividade antecipatória ao alimento (discutido a seguir).

No que se refere ao hipotálamo lateral, estudos de lesão também foram empregados na investigação da sua função na sincronização por alimento. Mistlberger e Rusak (1988) mostraram que ratos com lesão desta área poderiam apresentar comprometimento do comportamento antecipatório quando este era mensurado através da atividade locomotora, mas mantinham a antecipação comportamental na atividade direcionada a um comedouro. Mais recentemente, Mistlberger et al. (2003) relataram que a lesão específica de neurônios orexinérgicos (produtores do neuropeptídeo orexina: promotores de alerta, fome e atividade) no hipotálamo lateral não elimina a atividade antecipatória ao alimento em ratos. Por outro lado, camundongos transgênicos (com neurônios orexinérgicos inibidos) ou nocautes para orexina mantêm o comportamento antecipatório, mas têm dificuldade para adaptação ao horário de alimentação. Especificamente, apresentam menor amplitude da atividade antecipatória (Akiyama et al., 2004; Kaur et al., 2008), contudo, desenvolvem uma resposta antecipatória normal do ritmo de temperatura (Kaur et al., 2008).

Outras estruturas hipotalâmicas e não hipotalâmicas têm sido estudadas quanto à possível mediação da sincronização por alimento. A atividade antecipatória ao alimento foi observada em ratos com lesão do núcleo paraventricular (Mistlberger e Rusak, 1988), do núcleo arqueado (Mistlberger e Antle, 1999), e do núcleo dorsomedial do hipotálamo. Em um trabalho recente, no entanto, Tan et al. (2014) mostraram que a destruição no período pós-natal de neurônios produtores de AgRP (estimuladores da fome) no núcleo arqueado aumenta o número de dias necessários para o surgimento da atividade antecipatória em camundongos.

Com relação ao núcleo dorsomedial do hipotálamo, resultados distintos entre grupos de pesquisa diferentes levaram a uma discussão mais longa sobre a possível função desta área na sincronização por alimento. Assim como outras áreas hipotalâmicas, este núcleo também participa do controle do comportamento alimentar (Bellinger e Bernardis, 2002), bem como da regulação dos ritmos circadianos de sono, alimentação e atividade locomotora (Chou et al., 2003). Gooley et al. (2006) relataram que a lesão específica dos neurônios do núcleo dorsomedial através da injeção de ácido ibotênico extingue a antecipação da atividade locomotora e da temperatura corporal ao horário de alimentação em ratos. Praticamente ao mesmo tempo, Landry et al. (2006) mostraram que a antecipação persistia em ratos com lesão térmica do núcleo dorsomedial. Os estudos tinham diferenças metodológicas, por exemplo, nos sistemas de gaiolas e comedouros (Gooley e Saper, 2007; Landry e Mistlberger, 2007). Landry et al. (2007) repetiram o estudo usando gaiolas e comedouros iguais àqueles usados por Gooley et al. (2006). Entretanto, obtiveram novamente resultados diferentes, observando a continuidade da atividade antecipatória (Landry et al., 2007), algo também relatado em camundongos por um terceiro grupo de pesquisa (Moriya et al., 2009). Posteriormente, Acosta-Galvan et al. (2011) demonstraram em ratos que o núcleo dorsomedial inibe a atividade do núcleo supraquiasmático durante a atividade antecipatória ao



alimento na fase de claro, provavelmente através de conexões GABAérgicas. Esta ação do núcleo dorsomedial possivelmente facilita a manutenção do estado de vigília e a expressão do comportamento antecipatório, uma vez que na fase de claro o NSQ induz o sono em ratos (Mistlberger, 2005). Embora Acosta-Galvan et al. (2011) tenham demonstrado a participação do núcleo dorsomedial na expressão da atividade antecipatória ao alimento, seu estudo também comprova, através de lesões, que esta área não é unicamente responsável por conter o Oscilador Sincronizado por Alimento.

Mistlberger e Mumby (1992) mostraram que lesões de regiões relacionadas à memória e emoção (hipocampo e amígdala) ou motivação (núcleo acumbens [estriado ventral]) não extinguem a atividade antecipatória ao alimento em ratos. Apesar disso, considerando a importância da motivação para o comportamento alimentar, estudos recentes têm investigado o papel do sistema dopaminérgico na sincronização por alimento. Mendoza et al. (2005) mostraram que a lesão específica da sub-região do cerne do núcleo acumbens diminui o nível de atividade antecipatória em ratos, ao passo que a lesão da sub-região da casca incrementa o nível de atividade antecipatória, indicando a atuação desta área no comportamento antecipatório ao alimento. Liu et al. (2012) mostraram que a injeção intraperitoneal aguda de antagonistas dos receptores D1 e D2 de dopamina diminui o nível da atividade antecipatória ao alimento em camundongos. Em seguida, Gallardo et al. (2014) demonstraram, em camundongos, que: (1) animais nocaute para o receptor D1 de dopamina apresentam diminuição do nível de atividade antecipatória; (2) a recuperação da neurotransmissão dopaminérgica restrita ao estriado dorsal em animais nocaute para dopamina permite a reemergência da atividade antecipatória ao alimento; (3) a injeção intraperitoneal diária de um agonista do receptor D1 induz atividade antecipatória. A fase da atividade antecipatória ao alimento também pode ser manipulada pela neurotransmissão dopaminérgica, como demonstrado por Smit et al. (2013) ao injetarem um agonista do receptor D2 em ratos, resultando em atrasos de fase do comportamento antecipatório.

Assim como o hipotálamo, a área tegmental ventral (via mesolímbica dopaminérgica ao estriado ventral) e a substância nigra (via nigroestriatal ao estriado dorsal) mesencefálicas podem ser moduladas por sinais humorais periféricos reguladores da fome e da saciedade (insulina, leptina, grelina, etc.) (Figlewicz et al., 2003; Liu e Borgland, 2015; Volkow et al., 2017). Neste sentido, um estudo mostrou que camundongos nocautes para o receptor de grelina submetidos a restrição alimentar apresentaram menor ativação da área tegmental ventral durante a atividade antecipatória ao alimento (Lamont et al., 2012). Assim, é razoável supor que a ativação/inativação do sistema dopaminérgico central por sinais humorais periféricos junto com as evidências tratadas anteriormente colocam o sistema dopaminérgico como uma possível parte do sistema circadiano sincronizado por alimento (ver Lartigue e McDougale, 2019).

Estudos de lesão também foram empregados para investigar a participação da área postrema e no núcleo parabraquial no tronco encefálico em ratos. No caso de lesões da área postrema, a atividade antecipatória persistiu (Davidson

et al., 2001a). Lesões do núcleo parabraquial, no entanto, diminuíram drasticamente a antecipação do ritmo de temperatura e da atividade direcionada ao comedouro (Davidson et al. 2000). Os autores discutiram a possibilidade desta estrutura se constituir como uma via de entrada para o oscilador sincronizado por alimento (assumindo sua localização no sistema nervoso central), como uma via de saída (assumindo a localização do oscilador em órgãos periféricos), ou mesmo conter o próprio oscilador. Um trabalho mais recente mostra a persistência da expressão de c-fos no núcleo parabraquial em ratos, dias após o término do regime de restrição alimentar (Blum et al., 2012a), ou seja, a continuação da ativação mesmo depois da retirada da pista sincronizadora.

Dois estudos com ratos mostraram a extinção da antecipação do ritmo de temperatura mas não da atividade locomotora após remoção da hipófise (Davidson e Stephan, 1999) ou após lesão do córtex infralímbico, estrutura relacionada ao controle autonômico (Recabarren et al., 2005). Inversamente, a antecipação do ritmo de temperatura ao horário de alimentação se mantém intacta em camundongos nocautes para orexina ou para o receptor D1 de dopamina, que apresentam diminuição significativa da atividade antecipatória. (Kaur et al., 2008; Gallardo et al., 2014). Esses estudos indicam uma dissociação dos sistemas de saída controlados pelo oscilador sincronizado por alimento, uma vez que os efeitos de manipulações experimentais podem ser diferentes para diferentes ritmos.

Os ritmos circadianos são regulados por um conjunto de genes, denominados genes-relógio, que interagem entre si formando alças de auto-regulação que ciclam com período próximo de 24 horas (Takahashi, 2016). Esta base molecular, por sua vez, regula a expressão das diversas funções fisiológicas (Takahashi, 2016; Atger et al., 2017; Pilorz et al., 2018). A identificação dos genes-relógio se constituiu também como uma ferramenta para caracterizar osciladores circadianos em vários tecidos, além do NSQ (Brandstaetter, 2004; Guilding e Piggins, 2007). A busca pelo oscilador sincronizado por alimento tem se baseado também na identificação de estruturas sensíveis ao horário de alimentação ao examinar a expressão dos genes-relógio. Considerando o ritmo de expressão dos genes-relógio, vários estudos utilizando ratos e camundongos mostram a sincronização de estruturas centrais e tecidos periféricos ao horário de alimentação. As áreas centrais incluem núcleos hipotalâmicos (arqueado, ventromedial, paraventricular e dorsomedial), áreas do tronco encefálico (núcleo do trato solitário, área postrema), e estruturas corticolímbicas (amígdala, formação hipocampal e córtex pré-frontal) (Mieda et al., 2006; Ángeles-Castellanos et al., 2007; Verwey et al., 2007; Feillet et al., 2008; Verwey e Amir, 2009).

Com relação aos órgãos periféricos, o horário de alimentação é uma pista temporal capaz de sincronizar o fígado, o pâncreas, os rins, o estômago e o tecido adiposo em camundongos (Damiola et al., 2000; Zvonic et al., 2006; Lesauter et al., 2009). Também em camundongos, a secreção de insulina parece ser um sinal relevante para a sincronização do oscilador hepático ao horário de alimentação (Tahara et al., 2011; Dang et al., 2016; Oishi et al., 2017). Recentemente, Chavan et al. (2016) sugeriram a participação do fígado na

sincronização por alimento através da produção de corpos cetônicos que agiriam como sinalizadores para o sistema nervoso central em camundongos.

Os estudos utilizando lesão de áreas específicas no sistema nervoso central informaram onde o oscilador sincronizado por alimento “não está contido”. Reforçado pelos resultados que mostram a responsividade de diversos sítios ao horário de alimentação, hoje o conceito de um sistema com elementos múltiplos mediadores da sincronização por alimento parece mais aceitável. Nos últimos anos, a discussão se tornou mais sistemática no sentido de entender o oscilador sincronizado por alimento como um sistema de múltiplos componentes, no qual vários autores propõem modelos para explicar sua organização (Carneiro e Araujo, 2009; Aguilar-Roblero e Díaz-Muñoz, 2010; Silver et al., 2011; Blum et al., 2012b), embora sugestões neste sentido tenham sido discutidas anteriormente (Mistlberger e Rusak, 1988; Escobar et al., 1998). Nosso grupo, especificamente, propôs um modelo teórico no qual a flutuação de vários sinais humorais seria um elemento fundamental para o ajuste do oscilador sincronizado por alimento, composto por uma rede de estruturas do sistema nervoso central (Carneiro e Araujo, 2009).

Ainda que saibamos hoje que o horário de alimentação modifica a atividade de órgãos e tecidos periféricos, assim como de áreas no sistema nervoso central, não temos o conhecimento de onde, de fato, o sistema oscilador está localizado. No caso deste sistema estar contido na periferia, é imprescindível a existência de alguma via de sinalização para o sistema nervoso central. Neste caso, definiríamos conceitualmente esta sinalização como uma via de saída do oscilador. Caso o oscilador esteja localizado no sistema nervoso central, a sinalização periférica seria definida como uma via de entrada (Davidson, 2009).

### **Possíveis Vias para o Sistema Nervoso Central**

Dentro do tema da sincronização por alimento, o foco dos estudos tem sido a busca pelo oscilador sincronizado por alimento. Paralelamente, pesquisas têm agora buscado entender quais são as pistas ambientais e internas relacionadas com a ingestão de alimento importantes para a sincronização. Como também, quais são as vias que conduzem informação sobre a disponibilidade de alimento para as estruturas cerebrais responsáveis pela expressão de variáveis sincronizadas ao horário de alimentação? Esta sinalização estaria relacionada a respostas durante a fase cefálica da digestão, ou a sinais pós-prandiais?

No que concerne às possíveis vias de entrada para o sistema nervoso central, podemos elaborar pelo menos duas hipóteses, não necessariamente excludentes: 1) A sinalização ocorre através de sinais neurais e/ou humorais modificados pela presença de alimento no sistema digestório; e 2) A informação a respeito da disponibilidade de alimento é transmitida ao sistema nervoso central antes e durante a ingestão, por exemplo, através de sinais olfativos e/ou gustativos.

Considerando a hipótese 1, um possível papel do nervo vago na sincronização por alimento foi estudado por Comperatore e Stephan (1990). Os autores mostraram

que ratos com seccionamento do nervo vago submetidos à restrição alimentar continuavam exibindo atividade antecipatória ao horário de alimentação. Posteriormente, Davidson e Stephan (1998) lesionaram vias aferentes não-vagais utilizando injeções intraperitoneais de capsaicina (em razão de seu efeito neurotóxico), mostrando que as mesmas não são essenciais para a sincronização por alimento em ratos, uma vez que os animais também mantinham a antecipação.

Vários estudos apontam para a importância de múltiplos sinais humorais no controle da ingestão de alimento (Coll et al., 2007; Cummings e Overduin, 2007; Kim et al., 2014). Estes sinais variam ao longo das 24 h do dia, e alguns como grelina, leptina, insulina e GLP-1 (glucagon-like peptide-1), ajustam-se ao horário de alimentação durante regimes de restrição alimentar (Díaz-Muñoz et al., 2000; Bodosi et al., 2004; Martínez-Merlos et al., 2004; Drazen et al., 2006; Vahl et al., 2010). Considerando a ativação de diversas áreas no sistema nervoso central (hipotalâmicas e não hipotalâmicas) em resposta ao horário de alimentação, nós propusemos um modelo teórico no qual o oscilador sincronizado por alimento é constituído por uma rede de estruturas centrais sincronizadas direta e indiretamente por sinais humorais periféricos associados à ingestão de alimento (Carneiro e Araujo, 2009). A sinalização pós-prandial seria o sinal temporizador para este sistema, e incluiria por exemplo o aumento da glicose plasmática e da secreção de insulina, leptina, colecistocinina, peptídeo YY, e a redução da secreção de grelina (Carneiro e Araujo, 2009; Carneiro et al., 2010; Carneiro et al., 2012).

A possível função destes sinais na sincronização por alimento tem sido explorada em anos recentes. Szentirmai et al. (2010) mostraram que a deleção do gene codificador da grelina não extingue a antecipação ao alimento medida através da temperatura corporal, da atividade locomotora e do ritmo de sono-vigília. Similarmente, Gunapala et al. (2011) mostraram que a atividade antecipatória ao alimento permanece conservada em camundongos nocautes para leptina ou grelina. Por outro lado, camundongos nocautes para o receptor de grelina diminuem o nível de atividade antecipatória (Blum et al., 2009; Davis et al., 2011; Verhagen et al., 2011), ou necessitam de um maior número de dias para o estabelecimento da atividade antecipatória (Lamont et al., 2014). Além disso, o uso de antagonistas do receptor de grelina diminui a intensidade da atividade antecipatória ao alimento em ratos (Verhagen et al. 2011). Em contraste, ratos que não expressam receptores funcionais para o hormônio leptina, exibem atividade antecipatória ao alimento de forma exacerbada (Mistlberger e Marchant, 1999) e camundongos submetidos a injeção crônica de leptina diminuem o nível de atividade antecipatória (Ribeiro et al. 2011), indicando que grelina e leptina podem ter papéis moduladores opostos na expressão da atividade antecipatória ao alimento, sendo a leptina um modulador negativo e a grelina um modulador positivo. Ademais, pesquisas são necessárias para investigar possíveis efeitos destes hormônios na fase da atividade antecipatória ao alimento.

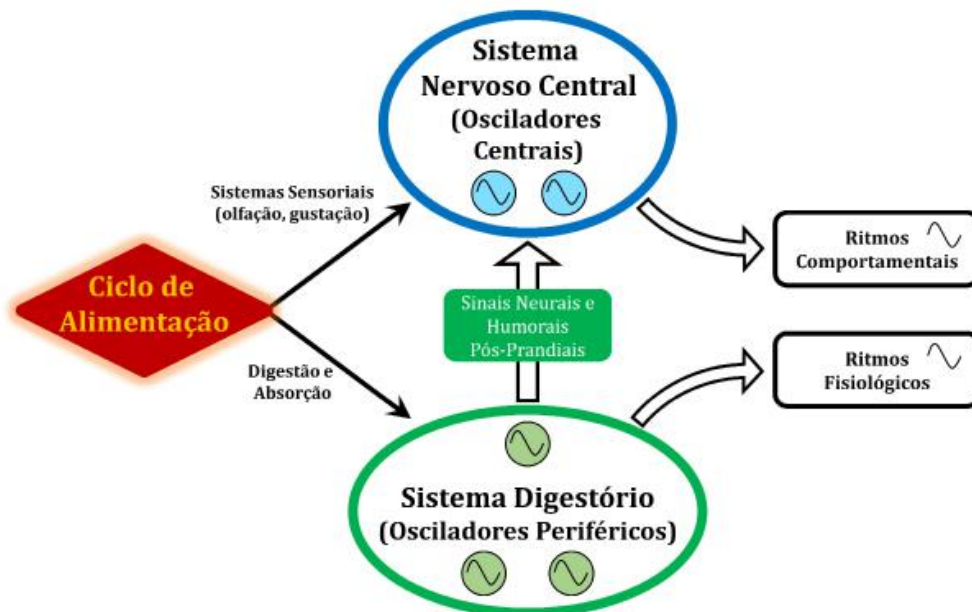
Com relação à insulina, Davidson et al. (2002) mostraram que animais com destruição das células  $\beta$  do pâncreas (produtoras de insulina) continuavam a expressar atividade antecipatória ao alimento, embora uma diferença visual no ritmo de atividade motora pareça presente. Como discutido anteriormente, a insulina parece atuar como um sinalizador para a sincronização do oscilador hepático (Tahara et al., 2011; Dang et al., 2016; Oishi et al., 2017). A inexistência de outros estudos avaliando o efeito da insulina na atividade antecipatória ao alimento dificulta elaboração de conclusões sobre o seu papel neste fenômeno.

Na linha da hipótese 2, Coleman e Hay (1990) investigaram se ratos anósmicos (com epitélio olfativo lesionado através de sulfato de zinco) perdiam a capacidade de exibir atividade antecipatória. O resultado foi negativo, os animais continuavam exibindo antecipação aos horários de alimentação. Resultado semelhante foi também obtido por Davidson et al. (2001b) em ratos que tiveram o bulbo olfatório removido. Os dois estudos partiram da hipótese de que a informação olfativa é importante para a sincronização por alimento, mas mostraram que tal sinalização não é unicamente responsável pela antecipação. Recentemente, entretanto, nosso grupo de pesquisa encontrou evidências de que a estimulação diária com odor induz atividade antecipatória leve em ratos com alimentação temporalmente restrita (Carneiro et al., 2019), o que pode indicar o sistema olfatório como parte do sistema de sincronização circadiana por alimento. Também em trabalho recente, Pavlovski et al. (2018) mostraram que a lesão do epitélio olfativo com sulfato de zinco (como realizado

por Coleman e Hay [1990]), extingue ou diminui drasticamente a atividade antecipatória ao alimento em camundongos. De fato, um corpo de evidências demonstra que o sistema olfatório é sensível aos horários de alimentação, o que é observado pela sincronização de genes relógio e de *c-fos* (marcador de atividade neuronal) no bulbo olfatório, no tubérculo olfatório e no córtex piriforme em coelhos e roedores (Nolasco et al., 2012; Caba et al., 2014; Olivo et al., 2014; Patton et al., 2014).

Além disso, Abraham et al. (2013) mostraram que, em camundongos com lesão do NSQ, a apresentação diária de uma mistura de odores (baunilha, banana, abacaxi, nozes e floral) promove resposta na atividade locomotora, com alguns indivíduos apresentando o padrão de locomoção ajustado ao horário de estimulação de forma antecipatória. Neste caso, o odor está determinando um padrão comportamental atuando em sistemas neurais que não incluem o NSQ. Em coelhos recém-nascidos, a apresentação diária do feromônio mamário sincroniza a atividade locomotora e a temperatura corporal, mas não parâmetros metabólicos (Montúfar-Chaveznavia et al., 2013), o que sugere um efeito sincronizador direto no sistema nervoso central, sem a participação de osciladores periféricos.

O papel do sistema gustatório na atividade antecipatória ao alimento tem sido escassamente explorado. Um estudo mostrou que ratos mantidos com alimentação regular (ração) à vontade não apresentam atividade antecipatória à ingestão diária de uma refeição palatável não nutritiva, sugerindo que a estimulação gustatória por si só não gera antecipação (Mistlberger e Rusak, 1987).



**Figura 3.** Modelo teórico esquemático do processo de sincronização por alimento. A figura indica possíveis mecanismos de sincronização de relógios centrais e periféricos, sinalização entre periferia-sistema nervoso central, e a interação dos osciladores para gerar ritmos sincronizados ao episódio de alimentação.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na sincronização por alimento, o uso de lesões na busca pelo oscilador como uma estrutura discreta demonstrou que muitas áreas não são individualmente necessárias para o processo, uma vez que sua remoção não elimina a atividade antecipatória ao alimento. Entretanto, com o advento de técnicas celulares, genéticas e moleculares, observou-se que a ritmicidade nestas áreas é sensível ao horário de alimentação. A falha em identificar, através de lesões, uma área específica no sistema nervoso central essencial para a sincronização por alimento pode indicar redundância na organização neural associada à expressão da atividade antecipatória ao alimento. Desta maneira, o organismo disporia de mecanismos compensatórios promovendo a antecipação apesar da ausência de uma região neural específica ou de uma determinada via de sinalização. Ao se identificar também tecidos periféricos sensíveis aos horários de alimentação, hoje o processo de sincronização por alimento começa a ser entendido como um fenômeno que envolve a coordenação da atividade de vários osciladores circadianos (periféricos e centrais), que regulam a fisiologia e o comportamento (figura 3).

Desvendar o sistema circadiano sincronizado pela alimentação em animais também pode ser relevante para entender os efeitos de horários de alimentação em humanos. Estudos recentes revelaram que a manipulação da janela temporal de alimentação diária pode promover melhora no peso corporal, no metabolismo e em parâmetros cardiovasculares em seres humanos (Melkani e Panda, 2017; Patterson e Sears, 2017; Sutton et al., 2018).

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos dois revisores pelas relevantes sugestões e comentários. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) através de suporte financeiro a John Fontenele-Araujo.

## REFERÊNCIAS

- Abraham U, Saleh M, Kramer A. 2013. Odor is a time cue for circadian behavior. *Journal of Biological Rhythms*, 28: 26-37.
- Acosta-Galvan G, Yi CX, van der Vliet J, Jhamandas JH, Panula P, Angeles-Castellanos M, Del Carmen Basualdo M, Escobar M, Ruijs RM. Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 5813-5818.
- Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. 2010. Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep and Biological Rhythms*, 8: 9-17.
- Akiyama M, Yuasa T, Hayasaka N, Horikawa K, Sakurai T, Shibata S. 2004. Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice. *European Journal of Neuroscience*, 20: 3054-3062.
- Anand BK, Brobeck JR. 1951. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 24: 23-40.
- Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Escobar C. 2007. Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in cortic limbic regions in rats. *Neuroscience*, 144: 344-355.
- Atger F, Mauvoisin D, Weger B, Gobet C, Gachon F. 2017. Regulation of mammalian physiology by interconnected circadian and feeding rhythms. *Frontiers in Endocrinology*, 8: 1-13.
- Bellinger LL, Bernardis LL. 2002. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: Lessons learned from lesioning studies. *Physiology & Behavior*, 76: 431-442.
- Blum ID, Lamont EW, Abizaid A. 2012b. Competing clocks: Metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36: 254-270.
- Blum ID, Patterson Z, Khazall R, Lamont EW, Sleeman MW, Horvath TL, Abizaid A. 2009. Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. *Neuroscience*, 164: 351-359.
- Blum ID, Waddington Lamont E, Rodrigues T, Abizaid A. 2012a. Isolating neural correlates of the pacemaker for food anticipation. *PLoS ONE*, 7: e36117.
- Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F, Krueger JM. 2004. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287: R1071-R1079.
- Brandstaetter R. 2004. Circadian lessons from peripheral clocks: is the time of the mammalian pacemaker up? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 5699-5700.
- Brobeck JR. 1946. Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiological Reviews*, 26: 541-559.
- Caba M, Pabello M, Moreno ML, Meza E. 2014. Main and accessory olfactory bulbs and their projections in the brain anticipate feeding in food-entrained rats. *Chronobiology International*, 31: 869-877.
- Carneiro BTS, Araujo JF. 2009. The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiology International*, 26: 1273-1289.
- Carneiro BTS, Araujo JF. 2012. Food entrainment: major and recent findings. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6: 83.
- Carneiro BTS, Dias HDB, Leocadio-Miguel MA, Fontenele-Araujo J. 2019. Daily presentation of regular food odor induces mild anticipatory activity in food-entrained rats. *Psychology & Neuroscience*, 19: xx-xx.
- Carneiro BTS, Fernandes DAC, Medeiros CFP, Diniz NL, Araujo JF. 2012. Daily anticipatory rhythms of behavior and body temperature in response to glucose availability in rats. *Psychology & Neuroscience*, 5: 191-197.
- Carneiro BTS, Fortes FS, Araujo JF. 2010. Anticipatory behavioral rhythm to scheduled glucose availability in rats. *Sleep Science*, 3: 27-31.
- Castro-faúndez J, Díaz J, Ocampo-garcés A. 2016. Temporal organization of the sleep-wake cycle under food entrainment in the rat. *SLEEP*, 39: 1451-1465.
- Chavan R, Feillet C, Costa SSE, Delorme JE, Okabe T, Ripperger JA, Albrecht U. 2016. Liver-derived ketone bodies are necessary for food anticipation. *Nature Communications*,

- 7: 10580.
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. 2003. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *The Journal of Neuroscience*, 23: 10691-10702.
- Clarke JD, Coleman GJ. 1986. Persistent meal-associated rhythms in SCN-lesioned rats. *Physiology & Behavior*, 36: 105-113.
- Coleman GJ, Harper S, Clarke JD, Armstrong S. 1982. Evidence for a separate meal-associated oscillator in the rat. *Physiology & Behavior*, 29: 107-115.
- Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. 2007. The hormonal control of food intake. *Cell*, 129: 251-262.
- Comperatore CA, Stephan FK. 1990. Effects of vagotomy on entrainment of activity rhythms to food access. *Physiology & Behavior*, 47: 671-678.
- Cummings DE, Overduin J. 2007. Gastrointestinal regulation of food intake. *Journal of Clinical Investigation*, 117: 13-23.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*, 14: 2950-2961.
- Dang F, Sun X, Ma X, Wu R, Zhang D, Chen Y, Xu Q, Wu Y, Liu Y. 2016. Insulin post-transcriptionally modulates Bmal1 protein to affect the hepatic circadian clock. *Nature Communications*, 7: 12696.
- Davidson AJ, Aragona BJ, Houtp TA, Stephan FK. 2001a. Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiology & Behavior*, 74: 349-354.
- Davidson AJ, Aragona BJ, Werner RM, Schroeder E, Smith JC, Stephan FK. 2001b. Food-anticipatory activity persists after olfactory bulb ablation in the rat. *Physiology & Behavior*, 72: 231-235.
- Davidson AJ, Cappendijk SLT, Stephan FK. 2000. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278: 1296-1304.
- Davidson AJ, Stephan FK. 1998. Circadian food anticipation persists in capsaicin deafferented rats. *Journal of Biological Rhythms*, 13: 422-429.
- Davidson AJ, Stephan FK. 1999. Feeding-entrained circadian rhythms in hypophysectomized rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277: R1376-R1384.
- Davidson AJ, Stokkan KA, Yamazaki S, Menaker M. 2002. Food-anticipatory activity and liver per1-luc activity in diabetic transgenic rats. *Physiology & Behavior*, 76: 21-26.
- Davidson AJ. 2009. Lesion studies targeting food-anticipatory activity. *European Journal of Neuroscience*, 30: 1658-1664.
- Davis JF, Choi DL, Clegg DJ, Benoit SC. 2011. Signaling through the ghrelin receptor modulates hippocampal function and meal anticipation in mice. *Physiology & Behavior*, 103: 39-43.
- Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C. 2000. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279: R2048-R2056.
- Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. 2006. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: Evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology*, 147: 23-30.
- Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. 1998. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274: R1309-R1316.
- Feillet CA, Mendoza J, Albrecht U, Pévet P, Challet E. 2008. Forebrain oscillators ticking with different clock hands. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37: 209-221.
- Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. 2003. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area / substantia nigra (VTA / SN) of the rat. *Brain Research*, 964: 107-115.
- Flôres DEFL. 2012. Investigando a sincronização fótica na natureza. *Revista Da Biologia*, 9: 7-12.
- Gallardo CM, Darvas M, Oviatt M, Chang CH, Michalik M, Huddy TF, Meyer EE, Shuster SA, Aguayo A, Hill EM, Kiani K, Ikpeazu J, Martinez JS, Purpura M, Smit AN, Patton DF, Mistlberger RE, Palmiter RD, Steele AD. 2014. Dopamine receptor 1 in the dorsal striatum regulate food anticipatory circadian activity rhythms in mice. *eLife*, 3: e03781.
- Gervais R, Pager J. 1979. Combined modulating effects of the general arousal and the specific hunger arousal on the olfactory bulb responses in the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 46: 87-94.
- Gooley JJ, Saper CB. 2007. Is food-directed behavior an appropriate measure of circadian entrainment to restricted daytime feeding? *Journal of Biological Rhythms*, 22: 479-483.
- Gooley JJ, Schomer A, Saper CB. 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nature Neuroscience*, 9: 398-407.
- Guilding C, Piggins HD. 2007. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: Are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *European Journal of Neuroscience*, 25: 3195-3216.
- Gunapala KM, Gallardo CM, Hsu CT, Steele AD. 2011. Single gene deletions of orexin, leptin, neuropeptide Y, and ghrelin do not appreciably alter food anticipatory activity in mice. *PLoS ONE*, 6: e18377.
- Hamaguchi Y, Tahara Y, Kuroda H, Haraguchi A, Shibata S. 2015. Entrainment of mouse peripheral circadian clocks to <24h feeding/fasting cycles under 24h light/dark conditions. *Scientific Reports*, 5: 14207.
- Inouye SIT. 1982. Ventromedial hypothalamic lesions eliminate anticipatory activities of restricted daily feeding schedules in the rat. *Brain Research*, 250: 183-187.
- Kaur S, Thankachan S, Begum S, Blanco-Centurion C, Sakurai T, Yanagisawa M, Shiromani PJ. 2008. Entrainment of temperature and activity rhythms to restricted feeding in orexin knock out mice. *Brain Research*, 1205: 47-54.
- Kim JD, Leyva S, Diano S. 2014. Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Frontiers in Physiology*, 5: 480.
- King BM. 2006. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiology & Behavior*, 87: 221-244.
- Krieger DT. 1974. Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology*, 95: 1195-1201.
- Krieger DT. 1980. Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Endocrinology*, 106: 649-654.
- Lamont EW, Bruton J, Blum ID, Abizaid A. 2014. Ghrelin

- receptor-knockout mice display alterations in circadian rhythms of activity and feeding under constant lighting conditions. *European Journal of Neuroscience*, 39: 207-217.
- Lamont EW, Patterson Z, Rodrigues T, Vallejos O, Blum ID, Abizaid A. 2012. Ghrelin-deficient mice have fewer orexin cells and reduced c-fos expression in the mesolimbic dopamine pathway under a restricted feeding paradigm. *Neuroscience*, 218: 12-19.
- Landry GJ, Mistlberger RE. 2007. Food entrainment: methodological issues. *Journal of Biological Rhythms*, 22: 484-487.
- Landry GJ, Simon MM, Webb IC, Mistlberger RE. 2006. Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290: R1527-1534.
- Landry GJ, Yamakawa GR, Webb IC, Mear RJ, Mistlberger RE. 2007. The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for the expression of circadian food-anticipatory activity in rats. *Journal of Biological Rhythms*, 22: 467-478.
- Lartigue G, McDougale M. 2019. Dorsal striatum dopamine oscillations: Setting the pace of food anticipatory activity. *Acta Physiologica*, 225: e13152.
- Lesauter J, Hoque N, Weintraub M, Pfaff DW, Silver R. 2009. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 13582-13587.
- Liu S, Borgland SL. 2015. Regulation of the mesolimbic dopamine circuit by feeding peptides. *Neuroscience*, 289: 19-42.
- Liu, Y, Liu T, Qu W, Hong Z, Urade Y, Huang Z. 2012. Dopamine is involved in food-anticipatory activity in mice. *Journal of Biological Rhythms*, 27: 398-409.
- Lutter M, Nestler EJ. 2009. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food Intake. *Journal of Nutrition*, 139: 629-632.
- Marchant EG, Mistlberger RE. 1997. Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Research*, 765: 273-282.
- Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C. 2004. Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *Journal of Endocrinology*, 181: 53-63.
- Melkani GC, Panda S. 2017. Time-restricted feeding for prevention and treatment of cardiometabolic disorders. *Journal of Physiology*, 595: 3691-3700.
- Mendes ALB, Menezes AAL, Azevedo CVM. 2008. The influence of social cues on circadian activity rhythm resynchronization to the light-dark cycle in common marmosets *Callithrix jacchus*. *Biological Rhythm Research*, 39: 469-479.
- Mendoza J, Angeles-Castellanos M, Escobar C. 2005. Differential role of the accumbens shell and core subterritories in food-entrained rhythms of rats. *Behavioral Brain Research*, 158: 133-142.
- Merkestein M, van Gestel MA, van der Zwaal EM, Brans MA, Luijendijk MC, van Rozen AJ, Hendriks J, Boender AJ, Pandit R, Adan R. 2014. GHS-R1a signaling in the DMH and VMH contributes to food anticipatory activity. *International Journal of Obesity*, 38: 610-618.
- Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M. 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 12150-12155.
- Mistlberger RE, Antle MC, Kilduff TS, Jones M. 2003. Food- and light-entrained circadian rhythms in rats with hypocretin-2- saporin ablations of the lateral hypothalamus. *Brain Research*, 980: 161-168.
- Mistlberger RE, Antle MC. 1999. Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Research*, 842: 73-83.
- Mistlberger RE, Marchant EG. 1995. Computational and entrainment models of circadian food-anticipatory activity: Evidence from non-24-hr feeding schedules. *Behavioral Neuroscience*, 109: 790-798.
- Mistlberger RE, Marchant EG. 1999. Enhanced food-anticipatory circadian rhythms in the genetically obese Zucker rat. *Physiology & Behavior*, 66: 329-335.
- Mistlberger RE, Mumby DG. 1992. The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behavioural Brain Research*, 47: 159-168.
- Mistlberger RE, Rechtschaffen A. 1984. Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiology & Behavior*, 33: 227-235.
- Mistlberger RE, Rusak B. 1987. Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: Dependence on meal size and nutrient content. *Physiology & Behavior*, 41: 219-226.
- Mistlberger RE, Rusak B. 1988. Food-anticipatory circadian rhythms in rats with paraventricular and lateral hypothalamic ablations. *Journal of Biological Rhythms*, 3: 277-291.
- Mistlberger RE. 1992. Nonphotic entrainment of circadian activity rhythms in suprachiasmatic nuclei-ablated hamsters. *Behavioral Neuroscience*, 106: 192-202.
- Mistlberger RE. 1994. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 18: 171-195.
- Mistlberger RE. 2005. Circadian regulation of sleep in mammals: role of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research Reviews*, 49: 429-454.
- Moberg GP, Bellinger LL, Mendel VE. 1975. Effect of meal feeding on daily rhythms of plasma corticosterone and growth hormone in the rat. *Neuroendocrinology*, 19: 160-169.
- Montúfar-Chaveznavar R, Trejo-Muñoz L, Hernández-Campos O, Navarrete E, Caldelas I. 2013. Maternal olfactory cues synchronize the circadian system of artificially raised newborn rabbits. *PLoS ONE*, 8: e74048.
- Moore RY, Lenn NJ. 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 146: 1-14.
- Moriya T, Aida R, Kudo T, Akiyama M, Doi M, Hayasaka N, Nakahata N, Mistlberger R, Okamura H, Shibata S. 2009. The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for food-anticipatory circadian rhythms of behavior, temperature or clock gene expression in mice. *European Journal of Neuroscience*, 29: 1447-1460.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443: 289-295.
- Naylor E, Williams BG. 1984. Environmental entrainment of tidally rhythmic behaviour in marine animals. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 80: 201-208.
- Naylor E. 1996. Crab clockwork: the case for interactive circatidal and circadian oscillators controlling rhythmic locomotor activity of *Carcinus maenas*. *Chronobiology International*, 13: 153-161.



- Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, Isorna E. 2014. Crosstalking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *General and Comparative Endocrinology*, 205: 287–295.
- Nolasco N, Juárez C, Morgado E, Meza E, Caba M. 2012. A circadian clock in the olfactory bulb anticipates feeding during food anticipatory activity. *PLoS ONE*, 7: e47779.
- Oishi K, Yasumoto Y, Higo-Yamamoto S, Yamamoto S, Ohkura N. 2017. Feeding cycle-dependent circulating insulin fluctuation is not a dominant Zeitgeber for mouse peripheral clocks except in the liver: Differences between endogenous and exogenous insulin effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483: 165-170.
- Olivo D, Caba M, Gonzalez-Lima F, Vázquez A, Corona-Morales A. 2014. Circadian feeding entrains anticipatory metabolic activity in piriform cortex and olfactory tubercle, but not in suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 1592: 11–21.
- Patterson RE, Sears DD. 2017. Metabolic effects of intermittent fasting. *Annual Review of Nutrition*, 37: 371-393.
- Patton DF, Katsuyama, Angela M, Pavlovski I, Michalik M, Patterson Z, Parfyonov M, Smit AN, Marchant EG, Chung SH, Abizaid A, Storch KF, de la Iglesia H, Mistlberger RE. 2014. Circadian mechanisms of food anticipatory rhythms in rats fed once or twice daily: Clock gene and endocrine correlates. *PLoS ONE*, 9: e112451.
- Pavlovski I, Evans JA, Mistlberger RE. 2018. Feeding time entrains the olfactory bulb circadian clock in anosmic PER2::LUC mice. *Neuroscience*, 393: 175-184.
- Pezuk P, Mohawk JA, Yoshikawa T, Sellix MT, Menaker M. 2010. Circadian organization is governed by extra-SCN pacemakers. *Journal of Biological Rhythms*, 25: 432-441.
- Phillips JLM, Mikulka PJ. 1979. The effects of restricted food access upon locomotor activity in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Physiology & Behavior*, 23: 257-262.
- Pilorz V, Helfrich-Förster C, Oster H. 2018. The role of the circadian clock system in physiology. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 470: 227-239.
- Recabarren MP, Valdés JL, Fariás P, Serón-Ferré M, Torrealba F. 2005. Differential effects of infralimbic cortical lesions on temperature and locomotor activity responses to feeding in rats. *Neuroscience*, 134: 1413-1422.
- Ribeiro AC, Ceccarini G, Dupré C, Friedman JM, Pfaff DW, Mark AL. 2011. Contrasting effects of leptin on food anticipatory and total locomotor activity. *PLoS ONE*, 6: e23364.
- Ribeiro AC, Sawa E, Carren-LeSauter I, LeSauter J, Silver R, Pfaff DW. 2007. Two forces for arousal: Pitting hunger versus circadian influences and identifying neurons responsible for changes in behavioral arousal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 20078-20083.
- Richter CP. 1922. A behavioristic study of the activity of the rat. *Comparative Psychology Monographs*, 1: 1-55.
- Riede SJ, van der Vinne V, Hut RA. 2017. The flexible clock: predictive and reactive homeostasis, energy balance and the circadian regulation of sleep–wake timing. *The Journal of Experimental Biology*, 220: 738-749.
- Roky R, Kapás L, Taishi P, Fang J, Krueger JM. 1999. Food restriction alters the diurnal distribution of sleep in rats. *Physiology & Behavior*, 67: 697-703.
- Silver R, Balsam PD, Butler MP, LeSauter J. 2011. Food anticipation depends on oscillators and memories in both body and brain. *Physiology & Behavior*, 104: 562-571.
- Smit AN, Patton DF, Michalik M, Opiol H, Mistlberger RE. 2013. Dopaminergic regulation of circadian food anticipatory activity rhythms in rats. *PLoS ONE*, 8: e82831.
- Sousa-Pinto A, Castro-Correia J. 1970. Light microscopic observations on the possible retinohypothalamic projection in the rat. *Experimental Brain Research*, 11: 159-184.
- Stephan FK, Swann JM, Sisk CL. 1979. Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behavioral and Neural Biology*, 25: 346-363.
- Stephan FK, Zucker I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69: 1583-1586.
- Stephan FK. 1981. Limits of entrainment to periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions. *Journal of Comparative Physiology*, 143: 401-410.
- Stephan FK. 1984. Phase shifts of circadian rhythms in activity entrained to food access. *Physiology & Behavior*, 32: 663-671.
- Stephan FK. 2002. The “other” circadian system: food as a zeitgeber. *Journal of Biological Rhythms*, 17: 284-292.
- Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. 2018. Early time-restricted feeding improves insulin sensitivity, blood pressure, and oxidative stress even without weight loss in men with prediabetes. *Cell Metabolism*, 27: 1212-1221.
- Szentirmai E, Kapas L, Sun Y, Smith RG, Krueger JM. 2010. Restricted feeding-induced sleep, activity, and body temperature changes in normal and preproghrelin-deficient mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298: R467-R477.
- Tahara Y, Otsuka M, Fuse Y, Hirao A, Shibata S. 2011. Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of Per2 and Rev-erba with shifts in the liver clock. *Journal of Biological Rhythms*, 26: 230-240.
- Takahashi JS. 2016. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics*, 18: 164-179.
- Tan K, Knight ZA, Friedman JM. 2014. Ablation of AgRP neurons impairs adaption to restricted feeding. *Molecular Metabolism*, 3: 694-704.
- Vahl TP, Drazen DL, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC. 2010. Meal-anticipatory glucagon-like peptide-1 secretion in rats. *Endocrinology*, 151: 569-575.
- Verhagen LAW, Egecioglu, E, Luijendijk MCM, Hillebrand JJG, Adan RAH, Dickson SL. 2011. Acute and chronic suppression of the central ghrelin signaling system reveals a role in food anticipatory activity. *European Neuropsychopharmacology*, 21: 384-392.
- Verwey M, Amir S. 2009. Food-entrainable circadian oscillators in the brain. *European Journal of Neuroscience*, 30: 1650-1657.
- Verwey M, Khoja Z, Stewart J, Amir S. 2007. Differential regulation of the expression of Period2 protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience*, 147: 277-285.
- Volkow ND, Wise RA, Baler R. 2017. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nature Reviews*, 18: 741-752.
- Ware JV, Nelson OL, Robbins CT, Jansen HT. 2012. Temporal organization of activity in the brown bear (*Ursus arctos*): Roles of circadian rhythms, light, and food entrainment. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303: R890-R902.

Zvonic S, Ptitsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, Goh BC, Mynatt RL, Gimble JM. 2006. Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes*, 55: 962-970.

# Quem são as Anfisbênias?

## Who are the Amphisbaenians?

Henrique C. Costa<sup>1,2,3\*</sup> & Paulo C. A. Garcia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Endereço atual: Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil.

\*Contato: ccostah@gmail.com

**Resumo.** As anfisbênias são um intrigante grupo de répteis fossoriais, com cerca de 200 espécies conhecidas, distribuídas na América do Sul, Caribe, oeste do México, Flórida, África, Península Ibérica, Anatólia e Oriente Médio. Neste artigo, apresentamos uma visão geral sobre diferentes aspectos da biologia desses animais, incluindo suas principais características morfológicas, a diversidade atual e os avanços na compreensão de sua origem e relações evolutivas, graças a recentes estudos de paleontologia, sistemática filogenética e biogeografia.

**Palavras-chave.** *Amphisbaenia*, biodiversidade, cobra-de-duas-cabeças, réptil, Squamata.

**Abstract.** Amphisbaenians are an intriguing group of fossorial reptiles, with about 200 known species distributed in South America, Caribbean, western Mexico, Florida, Africa, Iberian Peninsula, Anatolia, and Middle East. In this article, we present a general view on their biology, including their main morphological characteristics, current diversity, and the advances in the knowledge regarding their origin and evolutionary relationships, based on recent studies on paleontology, phylogenetic systematics, and biogeography.

**Keywords.** *Amphisbaenia*; biodiversity, worm-lizard, reptiles, Squamata.

### Quem são as anfisbênias?

Os Squamata compõem 96,5% da diversidade de répteis vivos, com mais de 11.000 espécies atualmente reconhecidas (Uetz et al., 2019). Habitam quase todas as massas continentais do planeta, à exceção daquelas mais frias e algumas ilhas (Vitt e Caldwell, 2014). A ocupação dos mais variados nichos ecológicos por esses animais está atrelada a adaptações morfológicas diversas. Uma delas, a formação de um corpo serpentiforme — alongado e com a redução ou perda de membros — evoluiu ao menos 25 vezes no grupo (Wiens et al., 2006). As serpentes são os representantes mais conhecidos e diversificados, com mais de 3.700 espécies vivas (Uetz et al., 2019), mas constituem apenas uma das linhagens de Squamata serpentiformes. As demais são formadas por uma série de grupos de “lagartos”, representantes de diferentes famílias, como Anguillidae, Cordylidae, Dibamidae, Gymnophthalmidae, Pygopodidae e Scincidae (sensu lato), além das anfisbênias (*Amphisbaenia*) (Wiens et al., 2006).

As anfisbênias são animais de hábitos fossoriais (subterrâneos). Alimentam-se principalmente de artrópodes como formigas, cupins, larvas de besouros (Cruz Neto e Abe, 1993; Esteves et al., 2008) — algumas espécies, porém, são especializadas em consumir apenas larvas ou moluscos (Pregill, 1984; Al-Sadoon et al., 2016; Baeckens

et al., 2017). As anfisbênias são ovíparas, à exceção da espécie africana *Trogonophis wiegmanni* (vivípara) — há indícios de que os táxons africanos *Loveridgea* e *Monopeltis* também apresentem viviparidade. As ninhadas são pequenas, em média com 2–6 ovos/filhotes (Andrade et al., 2006). Os poucos estudos disponíveis indicam que a maturidade sexual é atingida entre aproximadamente 2 e 3,5 anos de idade e o ciclo reprodutivo das fêmeas é em geral bienal ou trienal (Bons e Saint-Girons, 1963; Papenfuss, 1982; Martín et al., 2011).

Algumas características morfológicas únicas permitem a identificação de uma anfisbênia mesmo por leigos. Seu tegumento é formado por uma série de estreitos anéis, cada qual constituído por várias pequenas escamas retangulares, chamadas “segmentos” (Gans, 1978; Vitt e Caldwell, 2014) — em geral, cada dois anéis corporais correspondem a uma vértebra (Gans, 1978). Esse aspecto externo anelado, somado ao pequeno tamanho de muitas espécies pode ter dado origem ao nome popular em inglês, *worm lizard* (“lagarto-verme”).

Um detalhe importante do tegumento das anfisbênias reside no fato dele possuir poucas conexões com o tronco. Com a ação de músculos especializados, cria-se um movimento retilíneo telescópico, similar ao de um acordeão, e o animal se locomove dentro das galerias subterrâneas.

Recebido: 04mai2019

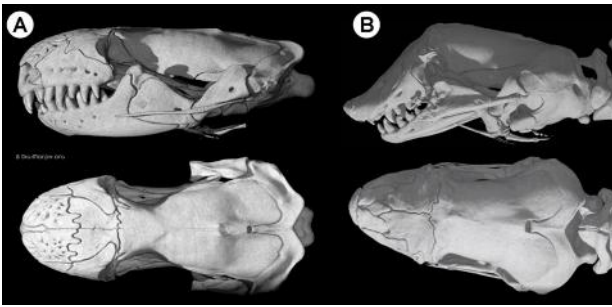
Aceito: 28ago2019

Publicado: 21out2019

Editado por Karen dos Santos Toledo e diagramado por Ana Botallo Quadros



neas (Gans, 1978; Pianka e Vitt, 2003). Esses túneis são escavados com movimentos da cabeça, cujo crânio é robusto, formado por poucos ossos, os anteriores em geral com suturas digitiformes, que aumentam a resistência (Gans, 1978) (Figura 1). As anfibênias, portanto, conseguem escavar solos com diferentes níveis de compactação, uma habilidade compartilhada apenas com as serpentes asiáticas da família Uropeltidae. Os demais escamados fossoriais geralmente se deslocam por solos arenosos, pouco compactados, ou utilizam galerias já existentes (Gans, 1968).



**Figura 1.** Crânio de *Amphisbaena fuliginosa* (A) e *Leposternon microcephalum* (B) (Amphisbaeniidae) em vista lateral (superior) e dorsal (inferior). (Modificado de: <http://www.digimorph.org/>).

A cauda das anfibênias é curta e usualmente arredondada, razão pela qual em diferentes países elas são chamadas de cobra-de-duas-cabeças, *culebra-de-dos-cabezas*, *víbora-de-dos-cabezas*, ou *two-headed-snake* (Aleman, 1952; Klappenbach, 1960; Riley, 1986; Mateus et al., 2011). Esses mesmos nomes também remetem à tendência da população em confundir as anfibênias com serpentes, até mesmo considerá-las peçonhentas ou venenosas (Loveridge, 1941; Mateus et al., 2011).

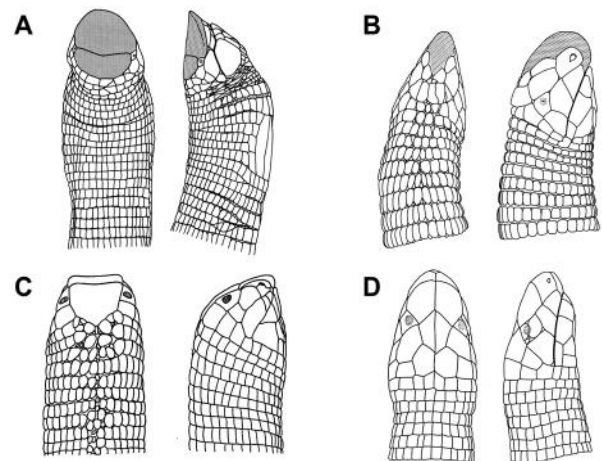
Outra característica marcante são os olhos reduzidos, geralmente simples pontos escuros sob uma escama de cada lado da cabeça, às vezes indistinguíveis (Gans, 1978). Trata-se de outra adaptação à vida subterrânea, motivo para mais nomes populares (alguns compartilhados com serpentes e cecílias) como cobra-cega, *blind schleiche*, *ciega*, *culebrita ciega*, ou *víbora ciega* (Marcgrave, 1648; Stejneger, 1904; Gans e Mathers, 1977; Bernarde, 2012) (Figura 2).



**Figura 2.** *Amphisbaena alba* (Amphisbaeniidae), uma das maiores espécies de Amphisbaenia. Note o tegumento formado por anéis de escamas, o olho reduzido, a cauda com formato similar à cabeça. Foto: Henrique C. Costa.

Da mesma maneira que observado em outros escamados serpentiformes, as anfibênias possuem adaptações morfológicas em alguns órgãos, que são alongados. No caso dos órgãos pares, como os rins e as gônadas, do lado direito tende a ter uma posição mais cranial. Curiosamente, nas anfibênias o pulmão direito é reduzido ou ausente, enquanto em outros vertebrados terrestres serpentiformes o mesmo ocorre com o pulmão esquerdo (Gans, 1978; Navega-Gonçalves, 2009).

Quatro tipos gerais de formato de crânio (e consequentemente de cabeça) evoluíram em Amphisbaenia, mais de uma vez e de forma independente (Gans, 1968; Kearney, 2003; Kearney e Stuart, 2004) (Figura 3). O primeiro morfotipo, mais diverso em número de espécies, apresenta uma cabeça arredondada (*round-headed*), usada como um aríete para escavar o solo, em um padrão de movimentação considerado não-especializado (Gans, 1968; Kearney, 2003). O segundo morfotipo possui o crânio comprimido lateralmente em forma de quilha (*keel-headed*), escavando galerias por meio de movimentos laterais alternados da cabeça (Gans, 1968; Kearney, 2003). O terceiro morfotipo é representado por espécies com o focinho deprimido dorso-ventralmente, deixando a cabeça em forma de pá (*shovel-headed*), que escava o solo por meio de uma série de movimentos, forçando a cabeça para frente e depois para baixo e para cima, também utilizando a região peitoral para compactação (Gans, 1968; Kearney, 2003; Hohl et al., 2014). Por fim, o quarto morfotipo, único sem representantes americanos, apresenta a cabeça em forma de cunha ou pá quadrada (*spade-headed*), escavando a partir de movimentos oscilatórios (Gans, 1968; Kearney, 2003).



**Figura 3.** Os diferentes formatos de cabeça de Amphisbaenia (vista dorsal e lateral). A) forma de pá (*shovel-headed*) (*Monopeltis anchietae*); B) forma de quilha (*keel-headed*) (*Amphisbaena kingii*); C) forma de cunha ou pá quadrada (*spade-headed*) (*Agamodon anguliceps*); D) forma redonda (*round-headed*) (*Amphisbaena munoai*). Modificado de Broadley et al. (1976), Gans e Rhodes (1964), Gans (1960, 1966). Reproduzidas com autorização de Department of Library Services, American Museum of Natural History.

Um grupo de três espécies endêmicas do México, pertencentes ao gênero *Bipes* (únicos representantes vivos da família Bipedidae), além de apresentar olhos relativamente bem desenvolvidos (Kearney, 2003), possui uma característica não observada em nenhuma outra anfisbênia: a presença de membros anteriores (Figura 4). Localmente conhecidas como *culebritas con manitas* (Bogert, 1964), essas espécies utilizam as patas dotadas de garras para auxiliar a entrada no solo a partir da superfície, mas é a cabeça que realiza a maior parte da escavação do túnel em si (Gans, 1968).



**Figura 4.** Exemplar de *Bipes tridactylus* (Bipedidae), espécie com membros anteriores desenvolvidos. Foto: Matthieu Berroneau (<http://www.matthieu-berroneau.fr/>). Reproduzida com autorização.

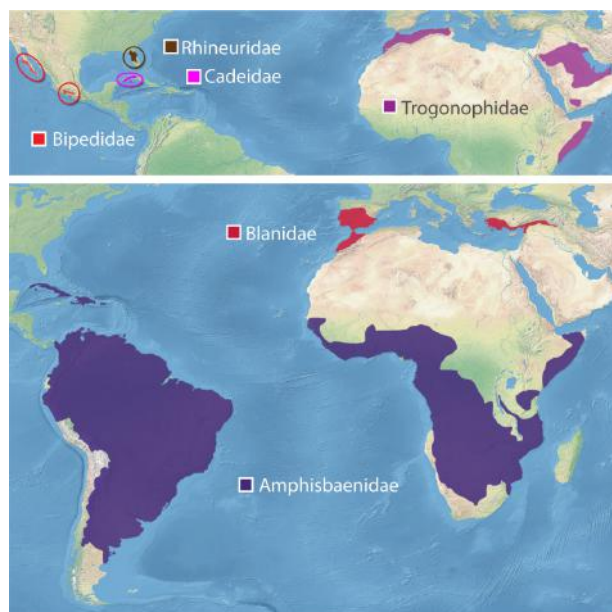
Embora os membros anteriores estejam presentes apenas em *Bipes*, as espécies das famílias Blanidae e Trogonophidae, encontradas no Velho Mundo, possuem elementos de cintura escapular (Kearney, 2002). Por outro lado, todos os gêneros de anfisbênias possuem elementos de cintura pélvica (Kearney, 2002). Usualmente, esses elementos não passam de um par de ossículos alongados, mas em *Bipes* e *Blanus* estão presentes em forma vestigial o ísquio, íleo, púbis e fêmur (Kearney, 2002).

#### Diversidade subterrânea

São reconhecidas hoje cerca de 200 espécies de Amphisbaenia (Uetz et al., 2019), distribuídas em seis famílias: Amphisbaenidae (África subsaariana, América do Sul, Panamá e Caribe), Bipedidae (península de Baja Califórnia e costa sudoeste do México), Blanidae (Península Ibérica, Marrocos, Turquia, ilhas do mar Egeu, Iraque, Síria e Líbano), Cadeidae (Cuba), Rhineuridae (Flórida, EUA) e Trogonophidae (norte e chifre da África e leste da península arábica) (Vitt e Caldwell, 2014) (Figura 5). Até recentemente, as espécies hoje incluídas em Blanidae e Cadeidae eram consideradas membros de Amphisbaenidae (Kearney, 2003; Vidal et al., 2008).

Amphisbaenidae é a família mais diversa, com cerca de 180 espécies, das quais 74 ocorrem no Brasil, país com maior riqueza de anfisbênias (Uetz et al., 2019). Os seguintes gêneros são atualmente reconhecidos: *Ancylocranium* (3 spp.), *Baikia* (1 spp.), *Chirindia* (5 spp.), *Cynisca* (20 spp.), *Dalophia* (6 spp.), *Geocalamus* (2 spp.), *Loveridgea* (2 spp.), *Monopeltis* (20 spp.) e *Zygaspis* (8 spp.) na África; *Amphisbaena* (~100 spp.), *Leposternon*

(11 spp.) e *Mesobaena* (2 spp.) na América e Caribe (Vitt e Caldwell, 2014). Até 2009, os gêneros *Anops*, *Aulura*, *Bronia* e *Cercolophia* eram reconhecidos, tendo sido sinonimizados com *Amphisbaena* com base em análises filogenéticas com dados moleculares, após ser constatado que não eram monofiléticos e seus caracteres ditos diagnósticos serem homoplásticos, ou seja, oriundos de evolução convergente (Mott e Vieites, 2009). *Leposternon*, embora monofilético, também se tornou sinônimo de *Amphisbaena* por se aninhar dentro deste (Mott e Vieites, 2009). Porém, esta hipótese de relação filogenética não foi amplamente aceita por taxonomistas que estudam o grupo (Ribeiro et al., 2011, 2018). Uma vez que esta situação faz de *Amphisbaena* um táxon parafilético, estudos posteriores poderão resolver a questão, provavelmente dividindo-o novamente em diversos gêneros, porém, monofiléticos.



**Figura 5.** Distribuição geográfica atual das famílias de Amphisbaenia. Mapa por Natália U. C. P. Ferreira.

À exceção do morfotipo com cabeça em forma de cunha, os outros três tipos de formato de cabeça são encontrados em Amphisbaenidae. As demais famílias com distribuição americana possuem diversidade muito menor que Amphisbaenidae. Rhineuridae é composta por uma única espécie com cabeça em forma de pá, *Rhineura floridana* (Vitt e Caldwell, 2014). Cadeidae possui duas espécies de cabeça arredondada (*Cadea blanoides*) e tendendo a quilhada (*C. palirostrata*). Bipedidae tem três espécies, *Bipes biporus*, *B. canaliculatus* e *B. tridactylus*, as quais, como comentado acima, intrigam pela presença de membros anteriores (Kearney, 2003; Vitt e Caldwell, 2014).

Blanidae possui sete espécies reconhecidas, todas com cabeça arredondada e bastante parecidas morfologicamente: *Blanus alexandri*, *B. aporus*, *B. cinereus*, *B. mettetali*, *B. strauschi*, *B. tingitanus* e *B. vandellii*. A primeira e a última foram espécies recém-descritas com base essencialmente em dados moleculares (Sindaco et al., 2014; Ceríaco e Bauer, 2018). Por fim, Trogonophidae apresenta



seis espécies em quatro gêneros: *Agamodon anguliceps*, *A. arabicus*, *A. compressus*, *Diplometopon zarudnyi*, *Pachycalamus brevis*, e *Trogonophis wiegmanii* (Uetz et al., 2019). À exceção da última, que possui cabeça arredondada, as demais são as únicas espécies com o morfotipo de cabeça em forma de cunha (Kearney, 2003).

### Os nomes *Amphisbaena* e *Amphisbaenia*

A taxonomia animal teve seu início oficial em 1758, com a publicação da 10ª edição de *Systema Naturae per Regna Tria*, de Carl von Linné (Carolus Linnaeus) (Linnaeus, 1758; International Commission on Zoological Nomenclature, 1999). Neste livro, ele descreve as espécies *Amphisbaena fuliginosa* e *Amphisbaena alba*, com base em exemplares da América do Sul, possivelmente do Suriname (Hoogmoed, 1973). *Amphisbaena* deriva do grego antigo e pode ser traduzido como “que caminha para os dois lados”. Trata-se de uma palavra que por séculos foi utilizada na Europa para identificar um lendário animal com duas cabeças, por vezes citado como peçonhento (Cameron e Gans, 1977). Seu primeiro registro escrito está na tragédia grega *Agamemnon*, de Ésquilo (séculos V e VI a.C.), quando Cassandra profetiza o assassinato do rei por sua esposa, Clitemnestra (Cameron e Gans, 1977): “*What awful monster suits her? A snake? An amphisbaena with a head at either end?*” (Johnston, 2017) (em tradução livre: “Que monstro horrível combina com ela? Uma serpente? Um anfisbena, com uma cabeça em cada extremidade?”) (Figura 6). A anfisbena da antiguidade, porém, parece ter sido baseada em uma espécie real, *Blanus strauchi*, encontrada no Mediterrâneo (Cameron e Gans, 1977; Sindaco et al., 2014).

O nome científico *Amphisbaena* (do qual deriva *Amphisbaenia*) tem então uma origem que remete mais à figura do animal lendário de duas cabeças do que à capacidade das anfisbênias reais em se deslocarem para frente ou para trás. Essa ideia pode ser reforçada ao observarmos outros nomes adotados por Linnaeus que também remetem a criaturas lendárias, como *Cerastes*, *Dipsas*, *hipnale* e *scytale* (McNamee, 2000).



**Figura 6.** Egito incita a hesitante Clitemnestra a matar Agamenon adormecido. Óleo de Pierre-Narcisse Guérin, 1817 (Wikipedia / Domínio público).

### Classificação confusa

Quando Linnaeus descreveu e classificou as primeiras anfisbênias em 1758 (*Amphisbaena fuliginosa* e *A. alba*), considerou-as como serpentes. Ao longo do século XIX, diversos autores publicaram classificações de répteis, geralmente considerando as anfisbênias como lagartos ou mesmo um grupo à parte, que em geral contava com outras formas serpentiformes. A presença de hemipênis e algumas características osteológicas deixavam clara a proximidade evolutiva entre anfisbênias, serpentes e lagartos. Porém, seguiram-se pelo século XX discussões sobre sua classificação como um grupo distinto daqueles dois ou como parte do último (Gans, 1978).

Na década de 1970 passou a vigorar a ideia de que os Squamata são compostos por três grupos: *Amphisbaenia*, *Sauria* (ou *Lacertilia*) e *Serpentes* (Gans, 1978). Mas, análises cladísticas mostraram um panorama onde alguns grupos de lagartos são mais proximamente relacionados às anfisbênias ou às serpentes que dos demais lagartos, deixando o nome *Sauria/Lacertilia* sem significado filogenético (Estes et al., 1988).

Apesar dos avanços, permanecia a dúvida com relação a qual o grupo evolutivamente mais próximo de *Amphisbaenia*. Não havia uma resposta conclusiva, embora a maioria dos estudos baseados em dados morfológicos indicasse um parentesco mais estreito com outros grupos de corpo alongado, como *Dibamidae*, ou mesmo *Serpentes* (Kearney, 2003; Conrad, 2008). Nos últimos anos, contudo, a inclusão de dados genéticos alterou drasticamente a visão sobre as relações evolutivas de *Squamata*. No que se refere às anfisbênias, tem sido sustentada a hipótese de que os lagartos da família *Lacertidae* constituem seu clado-irmão vivente (Harris et al., 1999; Vidal e Hedges, 2005; Pyron et al., 2013; Reeder et al., 2015).

### Origem misteriosa

Além do tegumento formado por uma série de escamas arranjadas em anéis, as anfisbênias podem ser diagnosticadas por caracteres osteológicos cranianos (Kearney, 2003), quatro deles considerados exclusivos: (1) presença de um grande dente medial no pré-maxilar; (2) vômer sobreposto ao palatino, se estendendo posteriormente ao nível do contato maxilar-ectopterigóide; (3) ramo quadrado do pterigóide curto e pequeno, envolvendo-se firmemente ao redor da superfície póstero-medial do quadrado; (4) forame óptico inteiramente dentro do órbita-esfenóide (Gauthier et al., 2012).

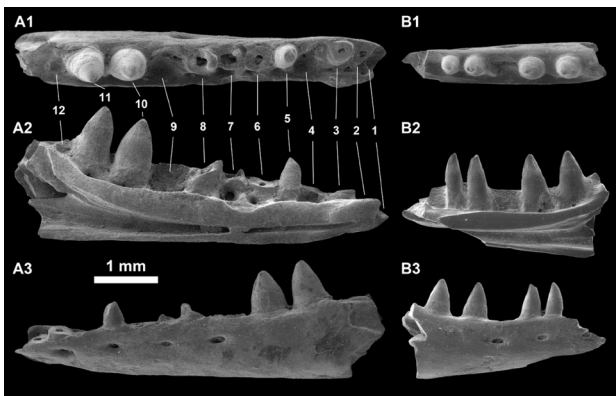
Essas características ósseas são importantes especialmente para a classificação de fósseis, os quais em geral são fragmentados. O registro fóssil de *Amphisbaenia* é relativamente extenso na era Cenozóica, mas não é distribuído geograficamente ou taxonomicamente de maneira uniforme. Poucos são os fósseis de *Amphisbaenidae*; para a África é conhecido apenas *Lophocranium rusingsensis*, do Mioceno inferior (23–15,9 milhões de anos) do Quênia (Charig e Gans, 1990). Já na América do Sul, o registro fossilífero de *Amphisbaenidae* é bem mais recente, datando do Plioceno (5,3–2,6 m.a) ao Pleistoceno (2,6–0,01 m.a) (Gans e Montero, 1998; Torres e Montero,



1998; Scanferla et al., 2006; Camolez e Zaher, 2010; Albino e Brizuela, 2014).

Fósseis de Trogonophidae têm sido reportados para o Mioceno inferior (23–15,9 m.a.) do Quênia (Kearney, 2003) e Plioceno superior (3,6–2,5 m.a.) do Marrocos (Bailon, 2000). Não há registro fóssil de Cadeidae (Kearney, 2003). *Anniealexandria gansi*, do Eoceno inferior (55,8–48,6 m.a.) dos EUA (Smith, 2009), foi recentemente classificada como um Bipedidade, sendo o primeiro fóssil conhecido para a família — *Anniealexandria* sp. do Eoceno francês (Augé, 2012), teria sido mais provavelmente um Blanidae (Longrich et al., 2015). Rhineuridae, atualmente com apenas uma espécie vivente, possui um amplo registro fóssil que percorre quase 65 milhões de anos do Paleoceno ao Pleistoceno da América do Norte, em especial o oeste estadunidense (Kearney, 2003; Hembree, 2007). Existem registros fósseis de Blanidae no norte da África (Rage, 1976; Bailon, 2000; Augé, 2012) e principalmente na Europa, a partir do Paleoceno superior (~60 m.a.) (Augé, 2012; Folie et al., 2013; Bolet et al., 2014; Čerňanský et al., 2015; Longrich et al., 2015).

Três famílias de Amphisbaenia são conhecidas unicamente por espécimes fósseis: Oligodontosauridae inclui apenas *Oligodontosaurus wyomingensis* (Paleoceno médio, ~62 m.a.), Chthonophidae inclui apenas *Chthonophis subterraneus* (Paleoceno inferior, 65,5–60 m.a.), ambas dos EUA (Longrich et al., 2015). Polyodontobaenidae foi descrita para agrupar duas espécies da Europa, *Polyodontobaena belgica* (Paleoceno inferior, 65,5–60 m.a.) (Figura 7) e *Camptognathosaurus parisiensis* (Paleoceno superior, 60–55,8 m.a.) (Folie et al., 2013), mas há indícios de se tratarem de Blanidae basais (Longrich et al., 2015). Esses fósseis, juntamente com *Plesiorhineura tsentasi* (Rhineuridae) (Paleoceno médio, EUA) são os mais antigos indiscutivelmente atribuídos a Amphisbaenia (Folie et al., 2013; Longrich et al., 2015; Rej e Sullivan, 2015). Além desses, algumas anfibênias fósseis ainda permanecem com suas relações filogenéticas não esclarecidas e também são registradas em diferentes épocas do Paleógeno (65,5–23 m.a.) da África (Bailon, 2000; Augé e Rage, 2006; Rage et al., 2013) e Ásia (Borsuk-Bialynicka, 1991).



**Figura 7.** *Polyodontobaena belgica* (Paleoceno inferior), um dos fósseis mais antigos de Amphisbaenia (65,5–60 milhões de anos). Dentário esquerdo em vista dorsal (A1), lingual (A2) e labial (A3) e dentário direito em vista dorsal (B1), lingual (B2) e labial (B3). Modificado de (Folie et al., 2013) (CC BY-NC-SA 3.0).

Considerando-se apenas fósseis “bem preservados”, *Spathorhynchus fossorium* (Figura 8) constituído por um crânio dos EUA datado do Eoceno médio (~50 m.a.), é tratado como o mais antigo fóssil conhecido de Amphisbaenia (Berman, 1973; Müller et al., 2016). Atualmente classificado como um Rhineuridae, *S. fossorium* provavelmente exibia olhos bem desenvolvidos, indicados pela presença de órbita ocular. Essa característica poderia sugerir que a redução dos olhos ocorreu posteriormente na história evolutiva das anfibênias. Contudo, um estudo recente sugere que a órbita não seria uma característica ancestral (plesiomorfia) do grupo, mas teria re-evoluído no clado composto por *Spathorhynchus* e outros dois gêneros fósseis, *Dyticonastis* e *Hyporhina* (Müller et al., 2016).



**Figura 8.** *Spathorhynchus fossorium* (Eoceno médio), um dos fósseis mais bem preservados de Amphisbaenia. Crânio em vista lateral. Repare a presença de órbita preservada. Fonte: <http://www.digimorph.org/>

A descoberta de *Sineoamphisbaena hexatabularis* (Figura 9), um fóssil chinês datado do Cretáceo superior (Campaniano, 83,5–70,6 m.a.), parecia clarear um pouco a história de origem das anfibênias, sendo considerado seu mais antigo representante (Wu et al., 1993, 1996, 1997). Mas, estudos subsequentes contestaram a proposta (Gao e Hou, 1996; Gao, 1997). Embora não exista um consenso quanto à posição filogenética de *S. hexatabularis*, o fóssil não é mais considerado uma anfibênia (Kearney, 2003; Conrad, 2008; Gauthier et al., 2012).

Outro fóssil ainda mais antigo, *Hodzhakulia magna*, da Mongólia, datado do Cretáceo inferior (Albiano, 112–99,6 m.a.), descrito com base em um maxilar, também chegou a ser considerado o representante mais antigo de Amphisbaenia (Gao e Hou, 1996), posição atualmente rejeitada (Alifanov, 2016). Vértabras fossilizadas encontradas na Espanha, datando do Cretáceo superior (Maastrichtiano, 70,6–65,5 m.a.), são consideradas como pertencentes a anfibênias por alguns autores, mas a classificação é questionada por outros (Augé, 2012).

Ainda permanece um mistério como seria o ancestral comum mais recente de Amphisbaenia e como o corpo alongado e a perda de membros teriam evoluído no grupo. Aos poucos, novas peças vão se encaixando no quebra-cabeças, mas algumas parecem contar histórias divergentes. Em 2011, o fóssil quase completo de um lagarto do Eoceno médio da Alemanha (Lutetiano, 48,6–40,4 m.a.), parecia fornecer respostas para a questão da origem das anfibênias. *Cryptolacerta hassiaca* foi descrito como

possuindo características intermediárias entre *Amphisbaenia* e *Lacertidae*, grupo de lagartos que tem sido sugerido como linhagem irmã das anfisbênias (Müller et al., 2011). *Cryptolacerta* teria sido um lagarto de hábitos criptozóicos, mas não fossoriais, ou seja, seria um habitante de serapilheira. Sua morfologia sugere ainda que modificações na estrutura craniana teriam evoluído antes do alongamento do corpo e da redução de membros na linhagem que daria origem a *Amphisbaenia* (Müller et al., 2011).

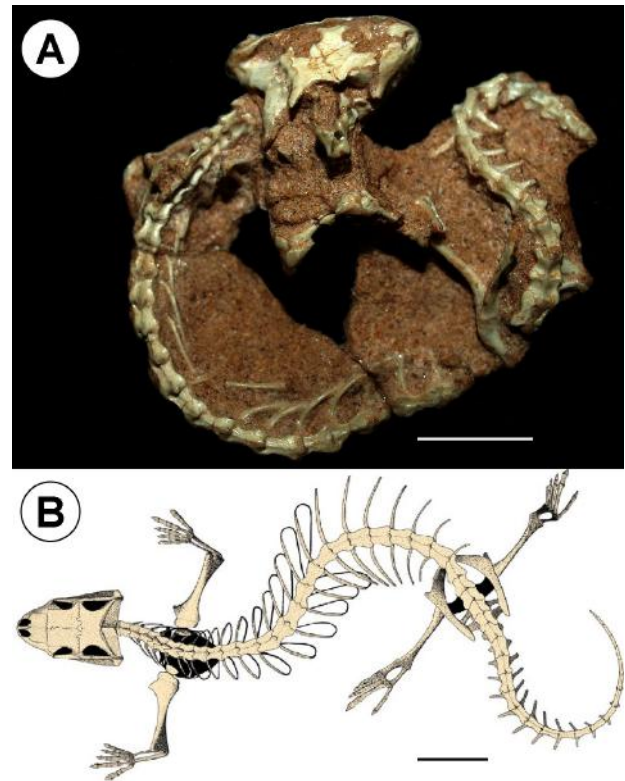


**Figura 9.** *Sineoamphisbaena hexatabularis* (Cretáceo superior), anteriormente considerado a mais antiga *Amphisbaenia*. Imagem em vista dorsal. Foto: Xiao-Chun Wu (editada). Escala: 10 mm.

Um ponto relevante é que a idade geológica de *Cryptolacerta* é mais recente que a de anfisbênias do Paleoceno (Tałanda, 2016). Portanto, deveriam haver fósseis mais antigos que preenchessem as lacunas da evolução das anfisbênias. É o caso de *Slavoia dareviskii*, que possuiria um parentesco evolutivo mais próximo com as anfisbênias que *Cryptolacerta*. Oriundo do Cretáceo Superior (Campaniano, 83,5–70,6 m.a.) da Mongólia, *S. dareviskii* foi descrito em 1984, e desde então foi relacionado a diversos grupos de “lagartos” (Tałanda, 2016). Com aproximadamente 50 exemplares conhecidos (crânio e/ou pós-crânio), *S. dareviskii* teria sido uma espécie de hábitos fossoriais ou semi-fossoriais, possuía um tronco não alongado, com quatro membros, e duas características consideradas até então exclusivas de *Amphisbaenia* (o vômer amplamente sobreposto ao palatino e o ramo quadrado do pterigóide ao redor do quadrado), além de outras características não exclusivas (Tałanda, 2016, 2017) (Figura 10).

O panorama atual sugere que *Cryptolacerta hassiaca* não seria grupo-irmão de *Amphisbaenia*, mas membro de uma linhagem próxima a *Lacertidae*, que teria desenvolvido de forma convergente algumas adaptações para fossorialidade (Longrich et al., 2015; Tałanda, 2016). Os estudos com *Slavoia dareviskii* sugerem que os ancestrais das anfisbênias teriam passado inicialmente por modificações na porção anterior do crânio, que tornaram o focinho mais compacto, uma adaptação para escavação utilizando a cabeça (Tałanda, 2016). O pescoço se tornou mais curto, com sete vértebras em vez de oito. De maneira similar, o número de vértebras caudais diminuiu, tornando a cauda mais curta. Os membros posteriores sofreram

redução, inicialmente com a perda de dígitos, enquanto os anteriores tornaram-se mais robustos, possivelmente auxiliando na escavação, tal como se observa em *Bipes*. Essas modificações teriam precedido a evolução do corpo alongado (Tałanda, 2016, 2017).



**Figura 10.** Um dos fósseis de *Slavoia dareviskii*, possível grupo-irmão de *Amphisbaenia* (A) e sua reconstrução paleoartística (B). Foto: Mateus Tałanda / Wikimedia Commons. Ilustração: Tałanda (2017) (CC BY 4.0). Escala: 10 mm.

#### Viagens transcontinentais

Nosso entendimento sobre a biogeografia de *Amphisbaenia* está intimamente relacionado ao conhecimento das relações filogenéticas entre as famílias, além das informações disponíveis pelo registro fóssil. Até o início do século XXI eram reconhecidas as famílias *Amphisbaenidae*, *Bipedidae*, *Rhineuridae* e *Trogonophidae*. A única hipótese formulada para explicar o padrão biogeográfico de *Amphisbaenia* era de que o grupo teria se originado no oeste do Mediterrâneo durante o Jurássico (199–145,5 m.a.), tendo as famílias surgido por vicariância. As linhagens americanas e africanas de *Amphisbaenidae*, por exemplo, teriam se separado durante a formação do oceano Atlântico (Gans, 1990).

Em 2003, análises baseadas em caracteres morfológicos indicaram que *Bipedidae* seria a linhagem irmã de um grupo formado pelas demais famílias de *Amphisbaenia* (Kearney, 2003). A cabeça com formato arredondado e a presença de membros anteriores seriam características plesiomórficas nas anfisbênias, tendo as demais formas de cabeça e a perda dos membros evoluído posteriormente (Kearney, 2003). Além disso, o gênero *Blanus* não faria

parte de Amphisbaenidae, como vinha sendo classificado, mas formava uma linhagem irmã do clado [Rhineuridae [Amphisbaenidae, Trogonophidae]]. Assim, a família Blanidae foi criada para incluir *Blanus* (Kearney, 2003).

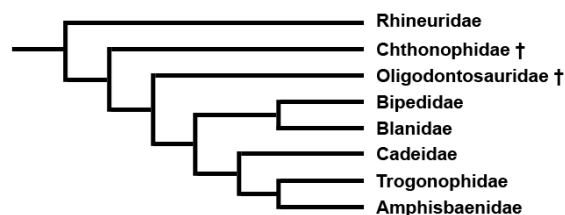
A presença de Bipedidae e Blanidae como linhagens basais e a ocorrência majoritária de fósseis no Hemisfério Norte indicavam que as anfisbênias teriam surgido na Laurásia. A linhagem que deu origem à Amphisbaenidae teria se dispersado para Gondwana antes da fragmentação do continente, o que justificaria a ocorrência da família na América e na África. Assim, a origem de Amphisbaenia dataria possivelmente do Jurássico superior ou Cretáceo inferior (~145 m.a.) (Kearney, 2003).

Análises filogenéticas usando dados moleculares, contudo, mudaram o panorama sobre as relações de parentesco evolutivo entre as famílias de Amphisbaenia, e, consequentemente, sua história biogeográfica. Ao contrário do que a morfologia sugeria, Rhineuridae seria a linhagem mais basal, ao passo que Bipedidae seria grupo-irmão do clado [Amphisbaenidae, Trogonophidae] (Kearney e Stuart, 2004; Macey et al., 2004). Esse resultado trazia conclusões interessantes: o ancestral comum mais recente de Amphisbaenia possuiria membros anteriores desenvolvidos, cintura pélvica vestigial, cabeça arredondada e as escamas peitorais não diferenciadas, características que foram modificadas em diferentes ocasiões, de forma independente, ao longo da evolução do grupo (Kearney e Stuart, 2004). Os membros anteriores, por exemplo, teriam sido perdidos de forma convergente em três ocasiões: em Rhineuridae, em Blanidae e no ancestral comum mais recente de Amphisbaenidae e Trogonophidae (Kearney e Stuart, 2004); a dentição acrodonte, observada apenas em Trogonophidae, seria uma característica apomórfica desta família (Macey et al., 2004).

Uma vez que os dados genéticos reforçavam Amphisbaenidae como monofilética, ganhava força a hipótese de que esta família teria se originado antes da formação do oceano Atlântico, há pelo menos 80 milhões de anos. Além disso, as relações de parentesco entre as famílias pareciam reforçar a ideia de uma origem de Amphisbaenia anterior à fragmentação da Pangea, cerca de 200 milhões de anos atrás (Macey et al., 2004; Hembree, 2006). Um estudo posterior incluiu pela primeira vez dados genéticos de *Cadea* em uma análise filogenética, indicando que esse gênero endêmico de Cuba é mais relacionado a Blanidae que a Amphisbaenidae (onde vinha sendo incluído); assim, a família Cadeidae foi criada para *Cadea* (Vidal et al., 2008) — posteriormente foi sugerido que Cadeidae é grupo-irmão de [Amphisbaenidae, Trogonophidae] (Longrich et al., 2015) (Figura 11).

O uso de datações do tempo de divergência por meio de relógio molecular trouxe uma impactante hipótese sobre a biogeografia de Amphisbaenia, antes considerada inviável devido ao hábito fossorial do grupo (Hembree, 2006): algumas linhagens se dispersaram atravessando o oceano Atlântico (Vidal et al. 2008; Longrich et al., 2015). Os dados mais recentes apontam a origem de Lacertibania (Lacertidae + Amphisbaenia) próximo do limite Jurássico-Cretáceo (145,5 m.a.), na Laurásia. Amphisbaenia teria

surgido no Cretáceo Inferior (145,5–112 m.a.), na América do Norte. A grande radiação do grupo teria ocorrido no limite Cretáceo-Paleógeno (K-Pg, 65,5 m.a.), após a chamada quinta extinção em massa, que teria eliminado competidores e predadores, possibilitando a expansão geográfica de Amphisbaenia (Longrich et al., 2015). As famílias Rhineuridae, Chthonophidae e Oligodontosauridae surgem no registro fóssil pouco após o limite K-Pg, onde hoje se localiza os EUA, ao passo que Bipedidae é registrada a partir do Eoceno Inferior (55,8–48,6 m.a.) (Longrich et al., 2015).

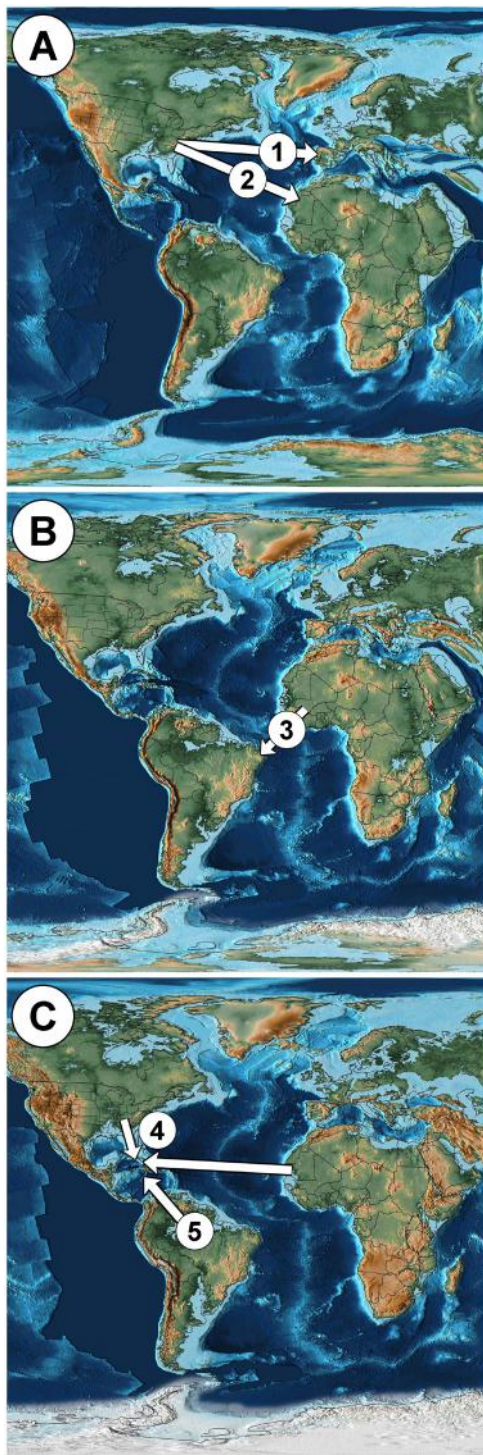


**Figura 11.** Relações filogenéticas entre as famílias de Amphisbaenia viventes e fósseis (†), baseado em Longrich et al., (2015) (Polyodontobaenidae considerado sinônimo de Blanidae).

Entre 63,6–61,6 m.a., no Paleoceno Inferior, o ancestral de Blanidae teria se dispersado da América do Norte para a Europa via oceano Atlântico. Outra dispersão oceânica teria ocorrido na mesma época, há 64,7–56 m.a., quando o ancestral de Afrobaenia (Amphisbaenidae + Trogonophidae) ou talvez de Afrobaenia + Cadeidae chegou à África a partir da América do Norte (Longrich et al., 2015). Na África teriam surgido as famílias Trogonophidae e Amphisbaenidae. Entre 43,4 a 35,6 m.a., um ramo de Amphisbaenidae se dispersou para a América do Sul, de onde também chegou ao Caribe entre o Eoceno e Oligoceno (34,7–30 m.a.). Por volta de 37 m.a. o ancestral que daria origem a Cadeidae se dispersou da África para o Caribe. É possível ainda que esta família tenha surgido de um ancestral que dispersou direto da América para Cuba, mas a existência de fósseis morfologicamente próximos a Cadeidae no Paleoceno africano dão menos suporte à hipótese do ancestral americano (Longrich et al., 2015) (Figura 12).

A ausência de pontes de terra ligando os continentes dentro dos períodos atribuídos pelo relógio molecular para a dispersão transcontinental das linhagens de Amphisbaenia, sugere apenas uma alternativa, as balsas naturais (Longrich et al., 2015). Por mais estranho que possa parecer, balsas naturais cruzando o oceano já foram observadas, em caso recente, transportando iguanas entre ilhas (Censky et al., 1998; Hedges e Conn, 2012). Alguns meses seriam necessários para uma balsa formada por restos de vegetação (troncos, raízes, etc.) atravessar o Atlântico, mas isso não inviabilizaria a travessia de anfisbênias; afinal, tratam-se de animais ectotérmicos com baixa necessidade energética e que se alimentam principalmente de invertebrados, os quais possivelmente também teriam sido transportados nas balsas (Vidal et al., 2008).





**Figura 12.** Dispersões oceânicas de *Amphisbaenia* ao longo do Paleoceno. (1) dispersão do ancestral de *Blanidae* da América do Norte para a Europa, 63,6–61,6 m.a.a. (2) dispersão do ancestral de *Afrobaenia* (ou de *Afrobaenia*+*Cadeidae*) da América do Norte para a África, 64,7–56,0 m.a.a. (3) dispersão do ancestral de *Amphisbaeninae* da África para a América do Sul, 43,4–35,8 m.a.a. (4) dispersão do ancestral de *Cadeidae* da África ou da América do Norte para Cuba, 37,2–0,0 m.a.a. (5) dispersão de *Amphisbaeninae* para o Caribe, 34,7–30,0 m.a.a. Baseado em Longrich et al. (2015) sobre mapas de Scotese (2016) representando parte do planeta há A) 66 m.a. (Cretáceo-Paleógeno), B) 40 m.a. (Eoceno) e C) 30 m.a. (Oligoceno).

### Por que estudar anfisbênias?

As anfisbênias são animais detentores de características morfológicas únicas e diversos aspectos de sua biologia e história evolutiva ainda são pouco compreendidos. A escassez de informações contribui para os chamados déficits de biodiversidade, que acabam por impactar negativamente estratégias de conservação (Hortal et al., 2015). Superar lacunas de conhecimento é fundamental para reduzir as perdas de biodiversidade, um dos grandes desafios da humanidade neste século (Ceballos et al., 2015). No caso específico das anfisbênias, o hábito fossorial dificulta seu estudo, tornando-as um grupo negligenciado. Muitas espécies aparentemente têm distribuição restrita (Meiri et al., 2018) e estima-se que 20% estejam ameaçadas de extinção (Bland e Böhm, 2016). Pesquisar os mais variados aspectos da biologia de *Amphisbaenia* é essencial para garantir sua preservação e evitar a perda de importante diversidade filogenética e funcional. Indo além, ao estudar esses animais, podemos entender melhor como o corpo serpentiforme e os hábitos fossoriais evoluíram em diferentes linhagens de répteis (Wiens et al., 2006), testar como a vida sob o solo impõe limitações morfofisiológicas (Gans, 1978; Abe e Johansen, 1987; Navas, 2004; Al-Sadoon et al., 2018), a influência de barreiras ambientais e geográficas da superfície no fluxo gênico de criaturas subterrâneas (Albert et al., 2007; Salvi et al., 2018), dentre outras hipóteses. Considerando ainda que anfisbênias em geral se alimentam de “engenheiros do solo” como formigas e cupins (Esteves et al., 2008) e parecem auxiliar na aeração do solo (Collen et al., 2008), há de se investigar também o seu impacto na dinâmica dos ecossistemas subterrâneos. Por fim, a biomecânica das anfisbênias para a escavação tem até mesmo inspirado o desenvolvimento de mecanismos robóticos (Thakoor e Kennedy, 1998). Assim, talvez a pergunta correta a se fazer seja: por que não estudar as anfisbênias?

### Agradecimentos

Somos gratos aos editores Ana B. Quadros, Karen S. Toledo e Tiago Pezzuti, a Adriano O. Maciel, Annie S. Hsiou, Renata Perez, Felipe F. Curcio, Felipe S. F. Leite e Fernando A. Perini pela leitura crítica do texto. Matthieu Berroneau por ceder a foto de *Bipes tridactylus* e Xiao-Chun Wu por ceder a foto de *Sineoamphisbaena hexatabularis*. Natália Pacheco Ferreira pelo auxílio na confecção dos mapas de distribuição. Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001 – através de uma bolsa de doutorado a HCC.

### Referências

- Abe, AS, Johansen, K. 1987. Gas Exchange and Ventilatory Responses to Hypoxia and Hypercapnia in *Amphisbaena alba* (Reptilia: Amphisbaenia). *Journal of Experimental Biology*, 127: 159-172.
- Al-Sadoon, MK, Paray, BA, Rudayni, HA. 2016. Diet of the Worm Lizard, *Diplometopon zarudnyi* (Nikolsky, 1907) in Riyadh province, Saudi

- Arabia (Reptilia: Trogonophidae. *Zoology in the Middle East*, 62(3): 227-230.
- Al-Sadoon, MK, Paray, BA, Rudayni, HA. 2018. Metabolism of the spade-headed Amphisbaenian worm lizard, *Diplometopon zarudnyi* (Nikolsky, 1907), in Saudi Arabia (Reptilia: Trogonophidae. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1): 178-181.
- Albert, EM, Zardoya, R, García-París, M. 2007. Phylogeographical and speciation patterns in subterranean worm lizards of the genus *Blanus* (Amphisbaenia: Blanidae. *Molecular Ecology*, 16(7): 1519-1531.
- Albino, AM, Brizuela, S. 2014. An Overview of the South American Fossil Squamates. *The Anatomical Record*, 297(3): 349-368.
- Aleman, C. 1952. Apuntes sobre reptiles y anfibios de la region Baruta - El Hatillo. *Memoria de La Sociedad de Ciencias Naturales de La Salle*, 12(31): 11-30.
- Alifanov, VR. 2016. Lizards of the family Hodzhakuliidae (Scincomorpha) from the lower Cretaceous of Mongolia. *Paleontological Journal*, 50(5): 504-513.
- Andrade, D, Nascimento, L, Abe, A. 2006. Habits hidden underground: a review on the reproduction of the Amphisbaenia with notes on four neotropical species. *Amphibia-Reptilia*, 27(2): 207-217.
- Augé, ML. 2012. Amphisbaenians from the European Eocene: a biogeographical review. *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments*, 92(4): 425-443.
- Augé, ML, Rage, JC. 2006. Herpetofaunas from the Upper Paleocene and Lower Eocene of Morocco. *Annales de Paléontologie*, 92(3): 235-253.
- Baeckens, S, García-Roa, R, Martín, J, Ortega, J, Huyghe, K, Van Damme, R. 2017. Fossorial and durophagous: implications of molluscivory for head size and bite capacity in a burrowing worm lizard. *Journal of Zoology*, 301(3): 193-205.
- Bailon, S. 2000. Amphibiens et reptiles du Pliocène terminal d'Ahl al Oughlam (Casablanca, Maroc. *Geodiversitas*, 22(4): 539-558.
- Berman, DS. 1973. *Spathorhynchus fossorium*, a Middle Eocene Amphisbaenian (Reptilia) from Wyoming. *Copeia*, 1973(4): 704-721.
- Bernarde, PS. 2012. Anfíbios e Répteis: Introdução ao Estudo da Herpetofauna Brasileira. Curitiba: Anolisbooks, 318 pp.
- Bland, LM, Böhm, M. 2016. Overcoming data deficiency in reptiles. *Biological Conservation*, 204, 16-22.
- Bogert, CM. 1964. "Little snake with hands": Amphisbaenids are a taxonomic enigma. *Natural History*, 73: 16-25.
- Bolet, A, Delfino, M, Fortuny, J, Almécija, S, Robles, JM, Alba, DM. 2014. An Amphisbaenian skull from the European Miocene and the evolution of Mediterranean worm lizards. *PLoS ONE*, 9(6): e98082.
- Bons, J, Saint-Girons, H. 1963. Ecologie et cycle sexuel des Amphisbaeniens du Maroc. *Bulletin de La Société Des Sciences Naturelles et Physiques Du Maroc*, 43(3): 117-158.
- Borsuk-Bialynicka, M. 1991. Cretaceous lizard occurrences in Mongolia. *Cretaceous Research*, 12: 607-608.
- Broadley, DG, Gans, C, Visser, J. 1976. Studies on amphisbaenians (Amphisbaenia, Reptilia. 6. The genera *Monopeltis* and *Dalophia* in southern Africa. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 175(5): 311-486.
- Cameron, HD, Gans, C. 1977. The *Amphisbaena* of antiquity: thoughts about the origin of the name. *British Journal of Herpetology*, 5: 603-606.
- Camolez, T, Zaher, H. 2010. Levantamento, identificação e descrição da fauna de Squamata do Quaternário brasileiro (Lepidosauria. *Arquivos de Zoologia*, 41(1): 1-96.
- Ceballos, G, Ehrlich, PR, Barnosky, AD, Garcia, A, Pringle, RM, Palmer, TM. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, 1(5): e1400253-e1400253.
- Censky, EJ, Hodge, K, Dudley, J. 1998. Over-water dispersal of lizards due to hurricanes. *Nature*, 395: 556.
- Ceríaco, LMP, Bauer, AM. 2018. An integrative approach to the nomenclature and taxonomic status of the genus *Blanus* Wagler, 1830 (Squamata: Blanidae) from the Iberian Peninsula. *Journal of Natural History*, 52(13-16): 849-880.
- Čerňanský, A, Augé, ML, Rage, J. 2015. A complete mandible of a new amphisbaenian reptile (Squamata, Amphisbaenia) from the late middle eocene (Bartonian, Mp 16) of France. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 35(1): e902379.
- Charig, AJ, Gans, C. 1990. Two new amphisbaenians from the Lower Miocene of Kenya. *Bulletin of the British Museum of Natural History (Geology)*: 46(1): 19-36.
- Collen, B, Ram, M, Dewhurst, N, Clausnitzer, V, Kalkman, VJ, Cumberlidge, N, Baillie, JEM. 2008. Broadening the coverage of biodiversity assessments. In: Vié, JC, Hilton-Taylor, C, Stuart, SN, editores. *Wildlife in a changing World. An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species*. Gland: IUCN, p. 67-75.
- Conrad, JL. 2008. Phylogeny And Systematics Of Squamata (Reptilia) Based On Morphology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 310: 1-182.
- Costa, HC, Bérnils, RS. 2018. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*, 7(1): 11-57.



- Cruz Neto, AP, Abe, AS. 1993. Diet Composition of Two Syntopic Species of Neotropical Amphisbaenians, *Cercolophia roberti* and *Amphisbaena mertensii*. *Journal of Herpetology*, 27(2): 239-240.
- Estes, R, de Queiroz, K, Gauthier, J. 1988. Phylogenetic relationships within Squamata. In: Estes, R, Pregill, G, editores. *Phylogenetic Relationships of the Lizard Families. Essays Commemorating Charles L. Camp*. Stanford: Stanford University Press, p. 118-281.
- Esteves, FA, Brandão, CRF, Viegas, K. 2008. Subterranean ants (Hymenoptera, Formicidae) as prey of fossorial reptiles (Reptilia, Squamata: Amphisbaenidae) in Central Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 48(28): 329-334.
- Folie, A, Smith, R, Smith, T. 2013. New amphisbaenian lizards from the Early Paleogene of Europe and their implications for the early evolution of modern amphisbaenians. *Geologica Belgica*, 16(4): 227-235.
- Gans, C. 1960. Studies on Amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia). 1. A taxonomic revision of the Trogonophidae, and a functional interpretation of the amphisbaenid adaptative pattern. *Bulletin American Museum of Natural History*, 119(3): 129-204.
- Gans, C. 1966. Studies on Amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia) 3. The small species from southern South America commonly identified as *Amphisbaena darwini*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 134(3): 185-260.
- Gans, C. 1968. Relative success of divergent pathways in Amphisbaenian specialization. *The American Naturalist*, 102(926): 345-362.
- Gans, C. 1978. The characteristics and affinities of the Amphisbaenia. *The Transactions of the Zoological Society of London*, 34(4): 347-416.
- Gans, C. 1990. Patterns in amphisbaenian biogeography: a preliminary analysis. In: Peters, G, Hutterer, R, editores. *Vertebrates in the Tropics*. Bonn: Museum Alexander Koenig, p. 133-143.
- Gans, C, Mathers, S. 1977. *Amphisbaena medemi*, An Interesting New Species from Colombia (Amphisbaenia, Reptilia): with a Key to the Amphisbaenians of the Americas. *Fieldiana (Zoology)*: 72(2): 21-46.
- Gans, C, Montero, R. 1998. Two new fossil amphisbaenids (Reptilia: Squamata) from the Pleistocene of Lagoa Santa (Minas Gerais, Brazil). *Steenstrupia*, 24, 9-22.
- Gans, C, Rhodes, C. 1964. Notes on Amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia). 13 A Systematic Review of *Anops* Bell, 1833. *American Museum Novitates*, 2186, 1-25.
- Gao, K. 1997. *Sineoamphisbaena* phylogenetic relationships discussed: Reply. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 34(6): 886-889.
- Gao, K, Hou, L. 1996. Systematics and taxonomic diversity of squamates from the Upper Cretaceous Djadochta Formation, Bayan Mandahu, Gobi Desert, People's Republic of China. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 33(4): 578-598.
- Gauthier, JA, Kearney, M, Maisano, JA, Rieppel, O, Behlke, ADB. 2012. Assembling the squamate tree of life: Perspectives from the phenotype and the fossil record. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, 53(1): 3-308.
- Harris, DJ, Sinclair, EA, Mercader, NL, Marshall, JC, Crandall, KA. 1999. Squamate relationships based on c-mos nuclear DNA sequences. *Herpetological Journal*, 9: 147-151.
- Hedges, SB, Conn, CE. 2012. A new skink fauna from Caribbean islands (Squamata, Mabuyidae, Mabuyinae). *Zootaxa*, 3288: 1-244.
- Hembree, DI. 2006. Amphisbaenian paleobiogeography: Evidence of vicariance and geodispersal patterns. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 235(4): 340-354.
- Hembree, DI. 2007. Phylogenetic revision of the Rhineuridae (Reptilia: Squamata: Amphisbaenia) from the Eocene to Miocene of North America. *The University of Kansas Paleontological Contributions*, 15: 1-20.
- Hohl, LSL, Loguercio, MFC, Buendía, RA, Almeida-Santos, M, Viana, LA, Barros-Filho, JD, Rocha-Barbosa, O. 2014. Fossorial gait patterns and performance of a shovel-headed amphisbaenian. *Journal of Zoology*, 294(4): 234-240.
- Hoogmoed, MS. 1973. Notes on the herpetofauna of Surinam IV. The lizards and amphisbaenians of Surinam. *Biogeographica*, 4: 1-419.
- Hortal, J, de Bello, F, Diniz-Filho, JAF, Lewinsohn, TM, Lobo, JM, Ladle, RJ. 2015. Seven Shortfalls that Beset Large-Scale Knowledge of Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 46(1): 523-549.
- International Commission on Zoological Nomenclature. 1999. *International Code of Zoological Nomenclature*. 4ª Edição. Londres: International Trust for Zoological Nomenclature, 306 pp.
- Johnston, I. 2017. *Aeschylus: The Oresteia*. Nanaimo: Vancouver Island University. Disponível em: <http://johnstoniatexts.x10host.com/aeschylus/agamemnonhtml.html>. Acesso em: 4 de maio de 2019.
- Kearney, M. 2002. Appendicular Skeleton in Amphisbaenians (Reptilia: Squamata). *Copeia*, 2002(3): 719-738.
- Kearney, M. 2003. Systematics of the Amphisbaenia (Lepidosauria: Squamata) based on morphological evidence from recent and fossil forms. *Herpetological Monographs*, 17(1): 1-74.



- Kearney, M, Stuart, BL. 2004. Repeated evolution of limblessness and digging heads in worm lizards revealed by DNA from old bones. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 271(1549): 1677-1683.
- Klappenbach, MA. 1960. Notas herpetológicas, I. *Amphisbaena muñoai* n. sp. Amphisbaenidae. *Comunicaciones Zoológicas Del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 4(84): 1-12.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomus 1. 10<sup>a</sup> Edição. Estocolmo: L. Salvii.
- Longrich, NR, Vinther, J, Pyron, RA, Pisani, D, Gauthier, JA. 2015. Biogeography of worm lizards (Amphisbaenia) driven by end-Cretaceous mass extinction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1806): 1-10.
- Loveridge, A. 1941. Revision of the African lizards of the family Amphisbaenidae. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 87(5): 353-451.
- Macey, JR, Papenfuss, TJ, Kuehl, JV, Fourcade, HM, Boore, JL. 2004. Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(1): 22-31.
- Marcgrave, G. 1648. *Historiae rerum naturalium Brasiliae*. In: Piso, G, Marcgrave, G, editores. *Historia Naturalis Brasiliae: auspicio et beneficio illustriss. I. Mauriti Com. Nassau illius provinciae et maris summi praefecti adornata: in qua non tantum plantae et animalia, sed et indigenarum morbi, ingenia et mores describuntur et iconibus supra quingentas illustrantur*. Amsterdã: Johannes de Laet, p. 1-293.
- Martín, J, Polo-Cavia, N, Gonzalo, A, López, P, Civantos, E. 2011. Structure of a population of the amphisbaenian *Trogonophis wiegmanni* in North Africa. *Herpetologica*, 67(3): 250-257.
- Mateus, MB, Pinto, LCL, Moura, MR, Pires, MRS. 2011. A cobra-de-duas-cabeças na percepção dos moradores do povoado de Itatiaia, Minas Gerais. *Biotemas*, 24(3): 111-117.
- McNamee, G. 2000. *The Serpent's tale: snakes in folklore and literature*. Atenas e Londres: The University of Georgia Press. 168 pp.
- Meiri, S, Bauer, AM, Allison, A, Castro-Herrera, F, Chirio, L, Colli, G, Das, I, Doan, TM, Glaw, F, Grismer, LL, Hoogmoed, M, Kraus, F, LeBreton, M, Meirte, D, Nagy, ZT, Nogueira, CC, Oliver, P, Pauwels, OSG, Pincheira-Donoso, D, Shea, G, Sindaco, R, Tallowin, OJS, Torres-Carvajal, O, Trape, J-F, Uetz, P, Wagner, P, Wang, Y, Ziegler, T, Roll, U. 2018. Extinct, obscure or imaginary: The lizard species with the smallest ranges. *Diversity and Distributions*, 24(2): 262-273.
- Mott, T, Vieites, DR. 2009. Molecular phylogenetics reveals extreme morphological homoplasy in Brazilian worm lizards challenging current taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51(2): 190-200.
- Müller, J, Hipsley, CA, Head, JJ, Kardjilov, N, Hilger, A, Wuttke, M, Reisz, RR. 2011. Eocene lizard from Germany reveals amphisbaenian origins. *Nature*, 473(7347): 364-367.
- Müller, J, Hipsley, CA, Maisano, JA. 2016. Skull osteology of the Eocene amphisbaenian *Spathorhynchus fossorium* (Reptilia, Squamata) suggests convergent evolution and reversals of fossorial adaptations in worm lizards. *Journal of Anatomy*, 229(5): 615-630.
- Navas, CA. 2004. Morphological and physiological specialization for digging in amphisbaenians, an ancient lineage of fossorial vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 207(14): 2433-2441.
- Navega-Gonçalves, MEC. 2009. Anatomia visceral comparada de seis espécies de Amphisbaenidae (Squamata: Amphisbaenia). *Zoologia*, 26(3): 511-526.
- Papenfuss, TJ. 1982. The ecology and systematics of the amphisbaenian genus *Bipes*. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, 36: 42.
- Pianka, ER, Vitt, LJ. 2003. *Lizards: Windows to the Evolution of Diversity*. Berkeley: University of California Press. 348 pp.
- Pregill, G. 1984. Durophagous feeding adaptations in an Amphisbaenid. *Journal of Herpetology*, 18(2): 186-191.
- Pyron, RA, Burbrink, FT, Wiens, JJ. 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1): 93.
- Rage, J-C. 1976. Les Squamates du Miocène de Beni Mellal, Maroc. *Géologie Méditerranéenne*, 3(2): 57-70.
- Rage, J-C, Pickford, M, Senut, B. 2013. Amphibians and squamates from the middle Eocene of Namibia, with comments on pre-Miocene anurans from Africa. *Annales de Paléontologie*, 99(3): 217-242.
- Reeder, TW, Townsend, TM, Mulcahy, DG, Noonan, BP, Wood, PL, Sites, JW, Wiens, JJ. 2015. Integrated Analyses Resolve Conflicts over Squamate Reptile Phylogeny and Reveal Unexpected Placements for Fossil Taxa. *PLoS One*, 10(3): e0118199.
- Rej, JE, Sullivan, RM. 2015. A new specimen of *Plesiorhineura tsentasi* (Amphisbaenia, Rhineuridae) from the Paleocene (Torrejonian) of New Mexico. *New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin*, 67: 273-274.

- Ribeiro, S, Nogueira, C, Cintra, CED, Silva Jr., NJS, Zaher, H. 2011. Description of a new pored *Leposternon* (Squamata, Amphisbaenidae) from the Brazilian Cerrado. *South American Journal of Herpetology*, 6(3):177-188.
- Ribeiro, S, Silveira, AL, Santos-Jr., AP. 2018. A new species of *Leposternon* (Squamata: Amphisbaenidae) from Brazilian Cerrado with a key to pored species. *Journal of Herpetology*, 52(1): 50-58.
- Riley, J. 1986. The Underground Life of the Trinidad Worm-Lizard *Amphisbaena alba*. *Living World, Journal of the Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club*, 1985-1986: 24-25.
- Salvi, D, Perera, A, Sampaio, FL, Carranza, S, Harris, DJ. 2018. Underground cryptic speciation within the Maghreb: Multilocus phylogeography sheds light on the diversification of the checkerboard worm lizard *Trogonophis wiegmanni*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 120: 118-128.
- Scanferla, CA, Montero, R, Agnolin, FL. 2006. The first fossil record of *Amphisbaena heterozonata* from the Late Pleistocene of Buenos Aires province, Argentina. *South American Journal of Herpetology*, 1(2): 138-142.
- Scotese, CR. 2016. PALEOMAP: PaleoAtlas for GPlates and the PaleoData Plotter Program. Disponível em: <https://www.earthbyte.org/paleomap-paleoatlas-for-gplates/>. Acesso em: 04 de maio de 2019.
- Sindaco, R, Kornilios, P, Sacchi, R, Lymberakis, P. 2014. Taxonomic reassessment of *Blanus strauchi* (Bedriaga, 1884) (Squamata: Amphisbaenia: Blanidae): with the description of a new species from south-east Anatolia (Turkey). *Zootaxa*, 3795(3): 311-326.
- Smith, KT. 2009. A new lizard assemblage from the earliest eocene (Zone Wa0) of the Bighorn basin, Wyoming, USA: Biogeography during the warmest interval of the cenozoic. *Journal of Systematic Palaeontology*, 7(3): 299-358.
- Stejneger, L. 1904. The Herpetology of Porto Rico. Report of the United States National Museum, 1902(129): 549-724.
- Talanda, M. 2016. Cretaceous roots of the amphisbaenian lizards. *Zoologica Scripta*, 45(1): 1-8.
- Talanda, M. 2017. Evolution of postcranial skeleton in worm lizards inferred from its status in the Cretaceous stem-amphisbaenian *Slavoia darevskii*. *Acta Palaeontologica Polonica*, 62(1): 9-23.
- Thakoor, S, Kennedy, BA. 1998. Biomimetic systems based on smart actuators. *Proceedings of the 5th Annual International Symposium on Smart Structures and Materials*, 3326: 308-322.
- Torres, SE, Montero, R. 1998. *Leiosaurus marellii* Rusconi 1937, is a South American Amphisbaenid. *Journal of Herpetology*, 32(4): 602-604.
- Uetz, P, Freed, P, Hošek, J. 2019. The Reptile Database. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/>. Acesso em: 12 de setembro de 2019.
- Vidal, N, Azvolinsky, A, Cruaud, C, Hedges, SB. 2008. Origin of tropical American burrowing reptiles by transatlantic rafting. *Biology Letters*, 4(1): 115-118.
- Vidal, N, Hedges, SB. 2005. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *Comptes Rendus Biologies*, 328(10-11): 1000-1008.
- Vitt, LJ, Caldwell, JP. 2014. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 4ª Edição. São Diego: Academic Press. 776 pp.
- Webb, JK, Shine, R, Branch, WR, Harlow, PS. 2000. Life underground: food habits and reproductive biology of two amphisbaenian species from South Africa. *Journal of Herpetology*, 34(4): 520-516.
- Wiens, JJ, Brandley, MC, Reeder, TW. 2006. Why does a trait evolve multiple times within a clade? Repeated evolution of snakelike body form in squamate reptiles. *Evolution*, 60(1): 123-141.
- Wu, X-C, Brinkman, DB, Russell, AP, Dong, Z, Currie, PJ, Hou, L, Cui, G. 1993. Oldest known amphisbaenian from the Upper Cretaceous of Chinese Inner Mongolia. *Nature*, 366: 57-59.
- Wu, X-C, Brinkman, DB, Russell, AP. 1996. *Sineoamphisbaena hexatabularis*, an amphisbaenian (Diapsida: Squamata) from the Upper Cretaceous redbeds at Bayan Mandahu (Inner Mongolia, People's Republic of China): and comments on the phylogenetic relationships of the Amphisbaenia. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 33(4): 541-577.
- Wu, X-C, Russell, AP, Brinkman, DB. 1997. Discussion: Phylogenetic relationships of *Sineoamphisbaena hexatabularis*: further considerations. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 34(6): 883-885.

# 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<sup>1\*</sup>, Juliane Suzuki Amaral<sup>2</sup>, Maria Inês Borella<sup>3</sup>, Sérgio Ricardo Batlouni<sup>4</sup> & Renata Guimarães Moreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo (CEBIMar). Rodovia Manoel Hypólito do Rego, km 131,5, 11612-109, Pitangueiras, São Sebastião, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, Travessa 14, 321, 05508-090, São Paulo, SP, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. <sup>4</sup>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: honji@usp.br; Tel.: +55 12 38628459; Fax: +55 11 30918095.

**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, espermatídeos, 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.

Recebido: 19jun19

Aceito: 03dez19

Publicado: 31jan20

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

**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 Tamandateí (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 reofilicas (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 espermiacção 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<sub>2</sub>), 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) (23° 34' 36,5"S e 45° 54' 23,9" W). A frequência de amostragem foi planejada de acordo com o ciclo reprodutivo da espécie congênica *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 estágio 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 nº 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 -80°C 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) [ $IGS = (W_g / W_t) \times 100$ ] (Vazzoler, 1996) e as análises histológicas foram utilizadas para a classificação do desenvolvimento testicular de *S. hilarii*.

#### Análises histológicas

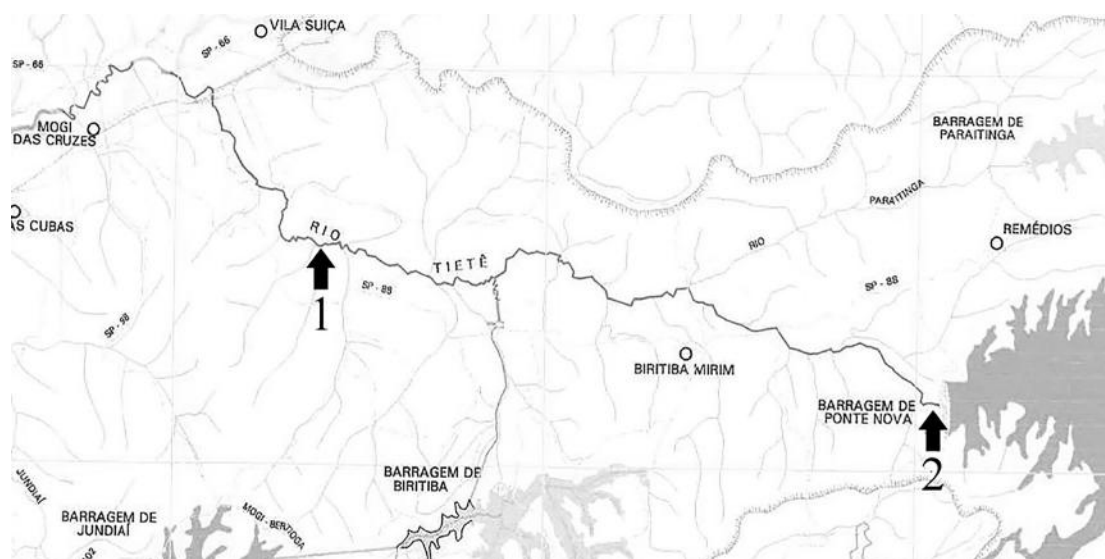
Para as análises histológicas, os testículos fixados foram processados de acordo com a metodologia descrita por Honji *et al.* (2009). Rapidamente, as amostras fixadas foram desidratadas gradualmente com uma série crescente de etanol, clareadas e diafanizadas em dimetilbenzeno (xilol), infiltradas e 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 polilisina (*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  $\leq 20,0$  (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 estágio 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<sub>2</sub> e 17-OHP) foram realizadas análises de variância (*one-way ANOVA*) seguida pelo teste de *Tukey's*. Adicionalmente, os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (Média  $\pm$  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  $27,10 \pm 1,0$  cm) e 110,00 e 400,00 g (com média de  $205,60 \pm 23,70$  g). Os parâmetros biométricos 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 espermatídes. 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;

**Espermatídes:** são as menores células que permane-

cem 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 espermatídes, 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. hilarii*, 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 espermatídes), 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 (Figura 3c) se comparado com o maduro (Figura 3d). Além disso, neste estágio 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  $0,78 \pm 0,23\%$  no estágio pré-espermatogênico, aumentando para  $5,13 \pm 0,58\%$  no estágio maduro (estágio espermatogênico) e, em seguida, regredindo para  $1,25 \pm 0,12\%$  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*

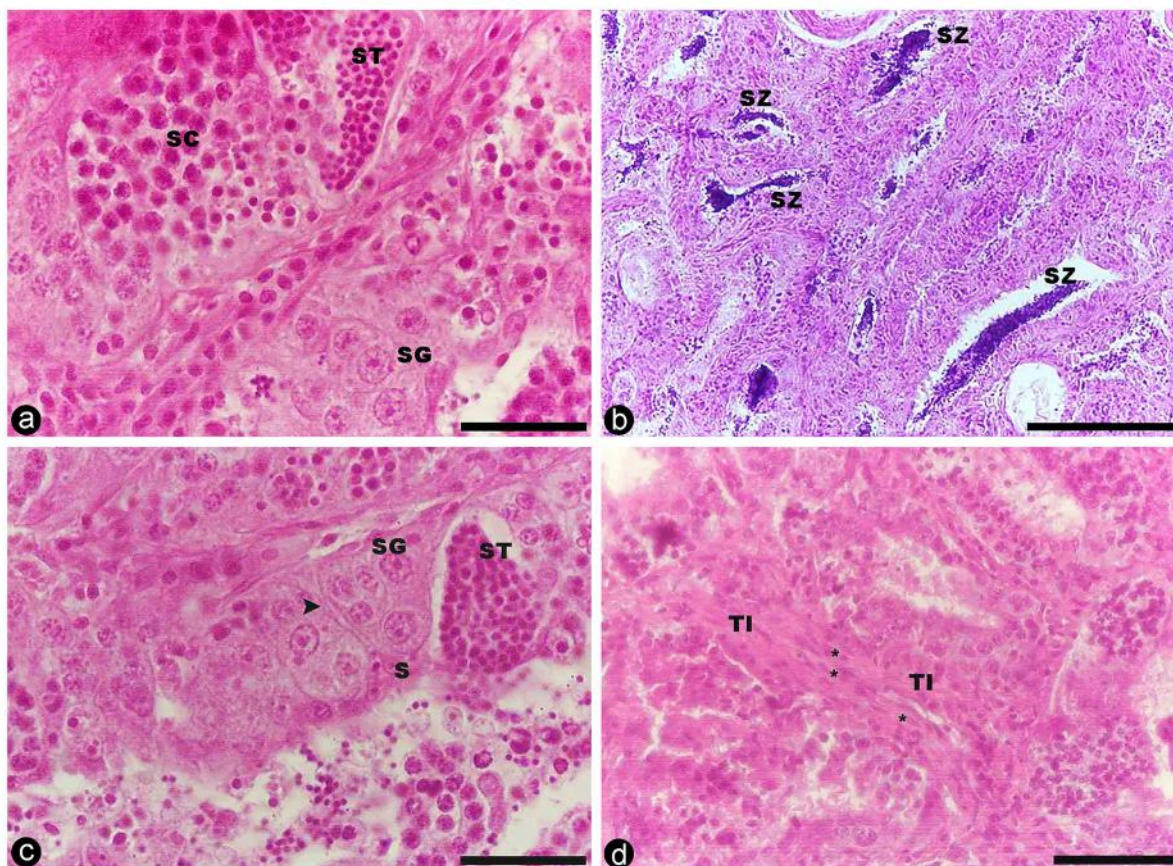
O perfil plasmático dos esteroides sexuais, T, 11-KT,  $E_2$ , 17-OHP foram apresentados, respectivamente, nas figuras 4 e 5.

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).

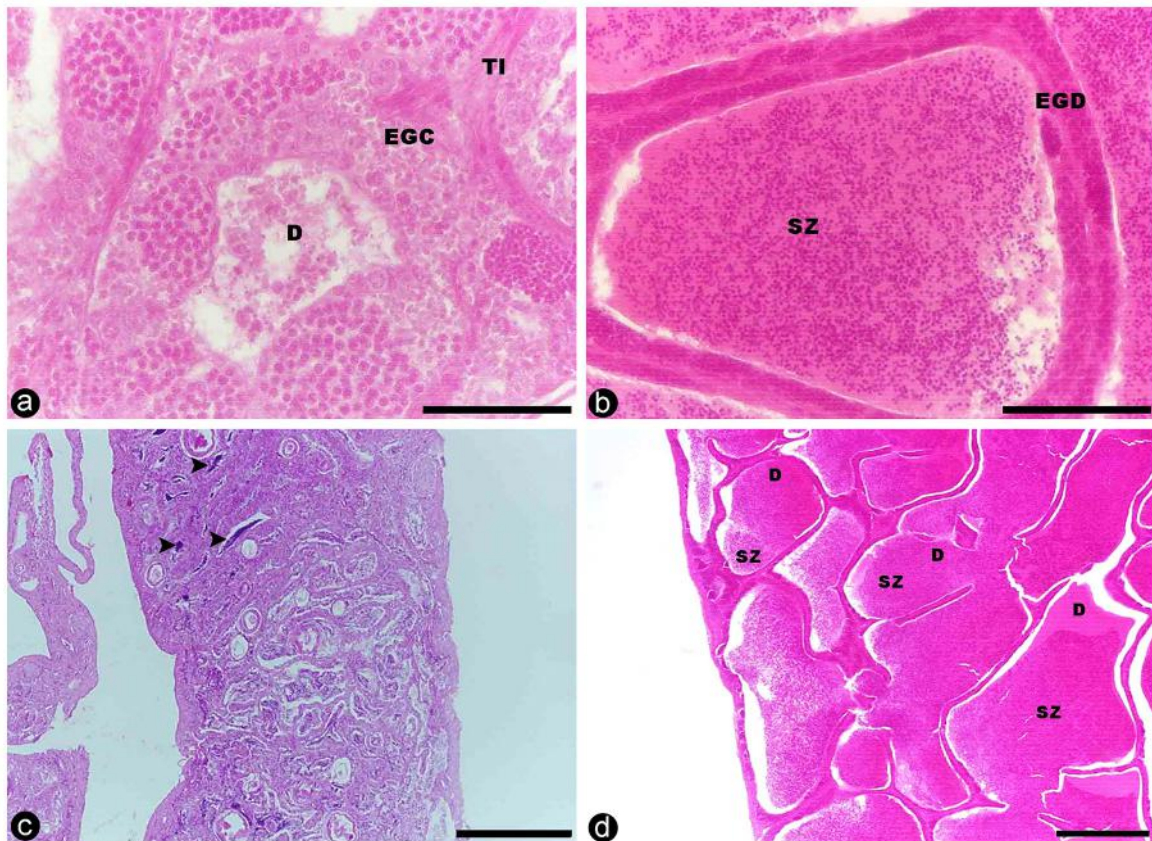
**Tabela 1.** Distribuição morfométrica e ponderal, índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) por estágio de maturação gonadal de *Salminus hilarii* em ambiente natural. Os dados são apresentados por média  $\pm$  erro padrão da média ( $M \pm EPM$ ). Valores seguidos por diferentes letras 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 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	236,25 $\pm$ 42,49 <sup>a</sup>	0,78 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
Espermatogênico	5	28,82 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	248,00 $\pm$ 28,35 <sup>a</sup>	5,13 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	0,73 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
Regressão	7	25,00 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	157,71 $\pm$ 40,43 <sup>a</sup>	1,25 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,82 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>

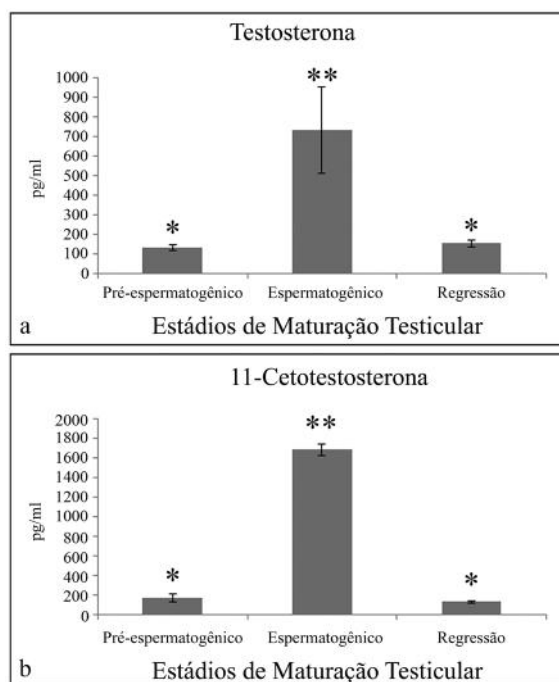


**Figura 2.** *Salminus hilarii*: Seções histológicas apresentando as diferentes fases de desenvolvimento testicular e os diferentes estádios de maturação gonadal: a) células testiculares: espermatogônias (SG), espermatócitos (SC) e espermatídes (ST); b) ductos testiculares com espermatozoides (SZ);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

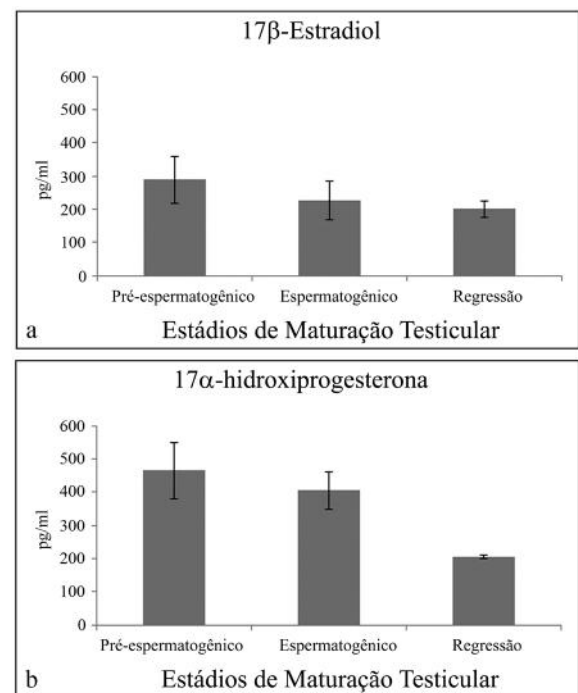




**Figura 3.** *Salminus hilarii*: Secções histológicas apresentando a alternância de epitélios (contínuo e descontínuo): a) epitélio germinativo contínuo (EGC), ducto (D) e tecido intersticial (TI); b) epitélio germinativo descontínuo (EGD) e espermatozoides (SZ); c) aspecto microscópico de secção transversal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



**Figura 4.** *Salminus hilarii*: Perfil plasmático dos esteroides sexuais por estágio de maturação gonadal: a) Testosterona; b) 11-Cetotestosterona. Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ( $M \pm EPM$ ). 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 estágio de maturação gonadal: a) 17 $\beta$ -estradiol; b) 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona. Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ( $M \pm EPM$ ).

## 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 teleosteos 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 teleosteos. 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 estágio regressão. Takahashi (2006) também relata que os maiores valores de IGS para os machos foi encontrado nos animais no estágio 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 estágio maduro e as análises histológicas dos testículos mostraram que os mesmos apresentam um epitélio germinativo descontínuo e que estavam no estágio 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 atresícos em fêmeas de *S. hilarii* (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 teleosteos 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 teleosteos 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 teleosteos (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  $E_2$  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 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -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 imunoenaios específicos para 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -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 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -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 espermição (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. *Neotrop. 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. Cochín, 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 franciscanus*, 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 (*Asytanax altiparanae*). In: Baldissotto B, Gomes LC. (Org). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil.* 1ª Editora UFMS. 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, Nuñez 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 progesterin 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 teleosteos: 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 (Ostariophysi: 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. Ensaio e cenas de pescarias. Companhia Melhoramentos de São Paulo. Editora Proprietária, 150p.
- Weingartner M, Zaniboni-Filho E. 2005. Dourado. In: Baldissotto B, Gomes LC. (Org). *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil.* Editora UFMS. 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. 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -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.