

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

TESE DE DOUTORADO

**AValiação da espermatogênese, níveis plasmáticos de esteróides sexuais
e expressão de HSP70, PCNA e caspase-3 em *Prochilodus argenteus*:
um estudo comparativo em dois pontos do rio São Francisco,
a jusante da barragem de Três Marias**

Fabício Flávio Theophilo Domingos

Belo Horizonte

2012

Fabrício Flávio Theophilo Domingos

**Avaliação da espermatogênese, níveis plasmáticos de esteroides sexuais
e expressão de HSP70, PCNA e caspase-3 em *Prochilodus argenteus*:
um estudo comparativo em dois pontos do rio São Francisco,
a jusante da barragem de Três Marias**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Área de Concentração em Biologia Celular).

Belo Horizonte
-Instituto de Ciências Biológicas-
UFMG 2012



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO
FABRÍCIO FLÁVIO THEOPHILO DOMINGOS

106/2012/07
entrada
2º/2008
2008710240

Às nove horas do dia 27 de agosto de 2012 reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "Avaliação da Espermatogênese, níveis plasmáticos de esteróides sexuais e expressão de HSP70, PCNA e caspase-3 em *Prochilodus argenteus*: um estudo comparativo em dois pontos do rio São Francisco, a jusante da barragem de Três Marias", requisito final para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Elizete Rizzo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Elizete Rizzo	UFMG	APROVADO
Dr. Nilo Bazzoli	PUC Minas	APROVADO
Profa. Dra. Tânia Mara Segatelli	UFMG	APROVADO
Prof. Dr. Hélio Batista dos Santos	UFSJ	APROVADO
Prof. Dr. José Enemir dos Santos	PUC Minas	APROVADO
Prof. Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta	UFV	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO.
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 27 de agosto de 2012.**

Profa. Dra. Elizete Rizzo _____
(orientadora)

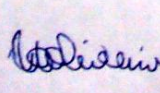
Prof. Dr. Nilo Bazzoli _____
(co-orientador)

Profa. Dra. Tânia Mara Segatelli _____

Prof. Dr. Hélio Batista dos Santos _____

Prof. Dr. José Enemir dos Santos _____

Prof. Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta _____


Prof. Cleida Aparecida de Oliveira
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

ORIENTADORA:

Dra. Elizete Rizzo

CO-ORIENTADOR:

Dr. Nilo Bazzoli

Este trabalho teve a colaboração dos seguintes pesquisadores:

Dra. Patrícia Massara Martinelli – UFMG;

Dr. Yoshimi Sato – CODEVASF.

Apoio institucional:

-Ao convênio CEMIG e Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba, CEMIG GT-CODEVASF;

-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, área de Pesca e Aqüicultura;

-Laboratório de Neurobiologia, ICB-UFMG;

-Centro de Microscopia Eletrônica do ICB-UFMG.

Apoio financeiro:

- CAPES e CAPES-REUNI – Bolsa de Doutorado (outubro de 2008 a agosto de 2012);

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*Dedico este trabalho as mulheres da minha vida,
Flá, Nanda, Mãe e em especial a minha Vó,
que partiu para o Oriente eterno no início dessa jornada de trabalho,*

Saudades...

Agradecimentos

A Deus pela oportunidade, mais uma vez.....

A família Bazzoli-Rizzo, pela a oportunidade de aprender e descobrir o fascínio de trabalhar com os peixes, e não seria possível sem a participação dos membros dessa família: Ralph, Hélio Violeta, Flávia, Fábio, Kinulpe, Roberto, Paula Kiki, Cássia, Paula, Yuri, Talin, Rafoso, Alessandro, Paulo, Guto, Cledma, Rogério e Mônica.

Aos meus eternos amigos Lipe, Bó, Teago, Zuco, Magá, Ralph, Boi e Jota.

Aos meus amigos do glorioso Bicho-Papão e do ± 30 pelos títulos e conversas fiadas!

Aos amigos e colegas da pós-graduação em Zoologia dos Vertebrados PUC-Minas e da pós-graduação em Biologia Celular (UFMG), principalmente ao Toniko, Samyra, Guilherme, Héder, Gleyde, Rafael e Sergio pelas dicas e artigos emprestados!

Ralph você tá vendo que os agradecimentos supracitados praticamente direcionam também para sua pessoa. Desta forma meu amigo de fé, irmão e companheiro de longas e futuras jornadas, te agradeço pela amizade sincera construída ao longo desses anos.....

Aos professores e funcionários do Programa de pós-graduação em Biologia Celular (UFMG).

A professora Patrícia Massara pelo incentivo, ensinamento e momentos de descontração.

A banca avaliadora por aceitar ler e criticar meu trabalho.

A minha amada e maravilhosa esposa Fernanda T. M. Araújo pelo amor incondicional desde 2002! Obrigado por estar sempre ao meu lado em todos os momentos! Te amo!

A minha família (Mãe, Flá, Vó, Nanda, Bernadin e o Miguel) pelo eterno amor e saibam que sou apenas o reflexo do esforço de todas vocês!

A vida é como uma grande corrida de bicicleta – cuja meta é cumprir a Lenda Pessoal.

Na largada, estamos juntos – compartilhando camaradagem e entusiasmo.

Mas, à medida que a corrida se desenvolve, a alegria inicial cede lugar aos verdadeiros desafios: o cansaço, a monotonia, as dúvidas quanto à própria capacidade.

Reparamos que alguns amigos desistiram do desafio – ainda estão correndo, mas apenas por que não podem parar no meio de uma estrada; eles são numerosos, pedalam ao lado do carro de apoio, conversam entre si, e cumprem uma obrigação.

Terminamos por nos distanciar deles; e então somos obrigados a enfrentar a solidão, as surpresas com as curvas desconhecidas, os problemas com a bicicleta. Perguntamo-nos finalmente se vale a pena tanto esforço.

Sim, vale. É só não desistir.

Paulo Coelho

Sumário

Resumo-----	I
Abstract-----	III
Lista de figuras-----	V
1. Introdução -----	1
1.1. Estrutura testicular e espermatogênese de peixes-----	1
1.2. Histofisiologia testicular de peixes-----	3
1.3. Proliferação e morte celular em testículos de teleósteos-----	5
1.4. Proteínas de choque térmico-----	7
1.5. Espécie de estudo-----	9
1.6. O rio São Francisco e a área de estudo-----	9
2. Justificativa e Objetivos -----	12
3. Material e Métodos -----	14
3.1 Amostras dos peixes-----	14
3.2. Parâmetros da água-----	15
3.3 Níveis de esteróides sexuais-----	15
3.4. Microscopia de luz -----	16
3.5. Reação de TUNEL in situ-----	16
3.6. Imunohistoquímica-----	16
3.7. Western blotting-----	17
3.8. ELISA para HSP70-----	17
3.9. Teste colorimétrico para caspase-3-----	18
3.10. Morfometria -----	18
3.11. Análise estatística-----	19
4. Resultados -----	20
4.1. Artigo 1 (Publicado na <i>Fish Physiology and Biochemistry</i>)-----	21
4.2. Artigo 2 (A ser publicado na <i>Microscopy Research and Technique</i>) -----	32
4.3. Resultados complementares-----	58
5. Discussão geral -----	60
6. Conclusões -----	64
7. Referências Bibliográficas -----	65

Resumo

O desenvolvimento e a maturação testicular de peixes são regulados por hormônios sexuais que influenciam nos processos de proliferação e morte celular das células germinativas e somáticas. O estresse causado pelas alterações das condições ambientais induz a expressão de proteínas de choque térmico (HSP's) que tem um papel fundamental na homeostase testicular. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a maturação testicular, a espermatogênese, os níveis plasmáticos de esteroides sexuais assim como os níveis de HSP70, proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL e caspase-3) em testículos de curimatã-pacu *Prochilodus argenteus*. Para isso, o estudo foi realizado em três etapas. Inicialmente avaliamos e comparamos a espermatogênese e os níveis de esteroides sexuais em curimatã-pacu coletados em dois pontos do rio São Francisco, a jusante da barragem de Três Marias. No período reprodutivo, a proporção volumétrica e o número de cistos de espermatogônias foram significativamente maiores em peixes do ponto 1, imediatamente a jusante da barragem, onde a proliferação celular e apoptose foram mais elevadas na fase espermatogonial. Em peixes do ponto 2, tanto os parâmetros morfométricos e as reações de PCNA e TUNEL foram mais elevados em cistos de espermatócitos. Esses resultados associados às mudanças sazonais da atividade testicular, níveis de testosterona, 17β -estradiol, 17α -hidroxiprogesterona e o índice gonadossomático indicam que a espermatogênese de *P. argenteus* é mais ativa em peixes capturados no ponto 2, após a confluência com o rio Abaeté. Na segunda etapa estudamos a expressão de HSP70, PCNA e caspase-3 durante o ciclo reprodutivo de *P. argenteus* coletados após a confluência com rio Abaeté, onde as condições ambientais são favoráveis para reprodução da espécie. Os níveis de HSP70 aumentaram significativamente em testículos de junho a dezembro (repouso a maturação testicular) diminuindo em março (regressão testicular). As marcações do PCNA acompanharam as variações sazonais da atividade testicular, sendo predominante em espermatogônias tipo A em junho e em espermatogônias tipo B em junho, setembro e março, enquanto espermatócitos primários foram marcados principalmente em dezembro. A reação TUNEL-positiva foi detectada no núcleo das células germinativas em todas as fases de desenvolvimento, exceto em espermatozóides. A atividade enzimática da caspase-3 diminuiu de junho a dezembro, aumentando em março. Esses resultados sugerem que HSP70 pode proteger as células germinativas da apoptose dependente de caspase-3

durante a atividade testicular. Na terceira etapa estudamos os níveis de HSP70 e caspase-3 como biomarcador de impacto ambiental utilizando testículos e fígado de *P. argenteus*. Os níveis de HSP70 e caspase-3 em testículos e fígado foram significativamente maiores nos peixes coletados no ponto 1 durante a estação chuvosa em relação à estação seca. Desta forma, nossos resultados demonstram que as análises morfométricas, os níveis de esteroides sexuais e a níveis proteicos de HSP70, PCNA e caspase-3 podem fornecer ferramentas úteis para a avaliação da espermatogênese de populações de peixes em ambientes naturais.

Palavras-chaves: *Prochilodus argenteus*, espermatogênese, esteróides sexuais, HSP70, PCNA, apoptose, rio São Francisco.

Abstract

The testicular development and maturation of fish are regulated by sex hormones that influence the processes of proliferation and cell death of germ and somatic cells. The stress caused by changes in environmental conditions induces the expression of heat shock proteins (HSP's) which have a key role in testis homeostasis. The objective of this work was to evaluate the testicular maturation, spermatogenesis, plasma levels of sex steroids as well as the expression of HSP70, cell proliferation (PCNA) and apoptosis (TUNEL and caspase-3) in testis of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus*. Thus, the study was performed in three steps. Initially we evaluated spermatogenesis and sex steroid levels in the curimatã-pacu collected at two sites in the São Francisco River, downstream from the Três Marias dam. During the reproductive period, the volumetric proportion and number of spermatogonia cysts were significantly higher in fish from site 1, immediately downstream from the dam, where cell proliferation and apoptosis were higher during spermatogonial phase. In fish from site 2, the morphometric parameters as well as the PCNA and TUNEL reactions were higher in spermatocytes cysts. These results associated with the seasonal changes of the testicular activity, levels of testosterone, 17 β -estradiol, 17 α -hydroxyprogesterone and gonadosomatic index indicated that spermatogenesis of *P. argenteus* is more active in fish captured in site 2, after the confluence with the Abaeté River. In the second step, we studied the expression of HSP70, PCNA and caspase-3 during the reproductive cycle of *P. argenteus* captured after the confluence with Abaeté River, where environmental conditions are favorable for the reproduction of the species. The levels of HSP70 increased significantly in testis from June to December (resting to testicular maturation) decreasing in March (testicular regression). The labelling of PCNA followed the seasonal variations of the testicular activity, being predominant in type A spermatogonia in June and in type B spermatogonia in June, September and March, while primary spermatocytes were particularly marked in December. The TUNEL-positive reaction was detected in the nucleus of germ cells at all stages of development, except in spermatozoa. Enzymatic activity of caspase-3 decreased from June to December, increasing in March. These results suggest that HSP70 may protect the germ cells from caspase-3-dependent apoptosis during testicular. In the third step, we studied the levels of HSP70 and caspase-3 as a biomarker of environmental impact using testis and liver of *P. argenteus*. The levels of HSP70 and caspase-3 in testis and liver were

significantly higher in fish collected at site1 during the rainy season compared to the dry season. Thus, our results demonstrate that morphometric analysis, levels of sex steroids and protein levels of HSP70, PCNA and caspase-3 can provide useful tools for the assessment of spermatogenesis in fish populations in natural environments.

Keywords: *Prochilodus argenteus*, spermatogenesis, sex steroids, HSP70, PCNA, apoptosis, São Francisco River.

Lista de figuras

Figura 1 - Vias de produção de esteroides sexuais em células de Leydig de peixes.....	3
Figura 2 - Atuação dos esteroides sexuais nas diferentes fases da espermatogênese.....	4
Figura 3 - Vias apoptóticas induzidas por toxinas durante a espermatogênese.....	6
Figura 4 - Regulação molecular de indução de HSP's em peixes.....	7
Figura 5 - Exemplar de curimatã-pacu <i>Prochilodus argenteus</i> do rio São Francisco.....	9
Figura 6 - Localização dos pontos de estudo no rio São Francisco a jusante da barragem de Três Marias.....	11
Figura 7 - Características macroscópicas de testículos de <i>P. argenteus</i> em diferentes estádios de maturação.....	15
Figura 8 - Níveis proteicos de HSP70 e caspase-3 em testículos e fígado de curimatã-pacu <i>Prochilodus argenteus</i> durante período seco e chuvoso.....	59

1. Introdução

1.1. Estrutura testicular e espermatogênese de peixes

Apesar das diferenças morfológicas ao longo da evolução, os testículos de vertebrados atuam em dois processos primordiais: espermatogênese e esteroidogênese (Weltzien *et al.*, 2004). Na maioria dos peixes teleósteos, os testículos são órgãos pares ligados dorsalmente à cavidade celômica pelo mesórquio, uma bainha fibrosa de tecido conjuntivo. Os testículos estão dispostos dorsalmente ao tubo digestivo e ventralmente aos rins percorrendo longitudinalmente a cavidade celômica. Apresentam comprimento semelhante, podendo estar parcialmente ou totalmente fundidos, unindo-se caudalmente para formar o ducto comum, que se exterioriza através da papila urogenital (Grier & Uribe-Aranzábal, 2009). Variações morfológicas em testículos (volume, coloração, irrigação sanguínea e turgidez) são comuns durante o ciclo reprodutivo (Bazzoli, 2003). Microscopicamente, os testículos são revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea, que emite septos para o interior do órgão, delimitando os compartimentos: intersticial (intertubular) e espermatogênico (tubular ou germinativo) (Schulz & Nóbrega, 2011a).

O compartimento intersticial é constituído pelas células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos, mastócitos, macrófagos e componentes dos tecidos nervoso e conjuntivo (Le Gac & Loir, 1999; Pudney, 1999). As células de Leydig estão envolvidas principalmente na síntese de esteróides sexuais responsáveis pela determinação de caracteres sexuais secundários. Podem ser encontradas isoladas ou em grupos, geralmente próximas aos vasos sanguíneos ou da albugínea (Haider, 2004; Nóbrega & Quagio-Grassiotto, 2007).

Os túbulos seminíferos são envolvidos pela membrana basal, uma estrutura acelular sintetizada pelas células de Sertoli e células peritubulares mióides (Koulish *et al.*, 2002; Schulz & Nóbrega, 2011a). O compartimento espermatogênico é constituído pelas células da linhagem germinativa e células de Sertoli cuja associação forma o epitélio germinativo (Grier & Lo Nostro, 2000; Grier, 2002). Em teleósteos, o epitélio germinativo é constituído por cistos formados por prolongamentos citoplasmáticos de células de Sertoli que envolvem as células germinativas (Grier, 1993; Pudney, 1995).

A espermatogênese é um processo cíclico, complexo e organizado que ocorre nos túbulos seminíferos dos vertebrados envolvendo diferentes formas de interações entre células somáticas e germinativas (Grier & Uribe-Aranzábal, 2009). Em geral, o

processo espermatogênico é dividido em três fases principais: espermatogonial, espermatocitária ou meiótica e espermiogênica.

Na fase espermatogonial a formação de cistos ocorre quando uma espermatogônia indiferenciada (SPG_{Aund}) é totalmente envolvida por prolongamentos citoplasmáticos de uma ou mais células de Sertoli (Nóbrega *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2010). Os cistos de SPG_{Aund} podem permanecer em estado quiescente dependendo da sazonalidade reprodutiva da espécie ou se auto-renovarem no início do crescimento testicular (Schulz *et al.*, 2012). Concomitantemente alguns cistos de SPG_{Aund} dividem-se e podem se originar em espermatogônias tipo A (SPG_A) que, através de sucessivas divisões mitóticas (o número de divisões depende da espécie), originarão espermatogônias secundárias (SPG_B), obtendo assim, um aumento geométrico de células germinativas com redução do diâmetro nuclear (Schulz *et al.*, 2010). As células germinativas resultantes das divisões mitóticas das SPG_A e SPG_B permanecem ligadas entre si por pontes citoplasmáticas devido à citocinese incompleta. Essas pontes citoplasmáticas são responsáveis pelo desenvolvimento sincrônico de um clone das células germinativas durante a espermatogênese (Schulz & Nóbrega, 2011a).

Na fase espermatocitária ou meiótica as SPG_B diferencia em espermatócitos primários ($SPTC_1$). Durante a prófase meiótica (leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno) ocorrem os processos de recombinação e segregação gênica, importantes para a diversidade da espécie, produção de RNAm, essenciais para fase espermiogênica, além da troca das histonas por protaminas durante a compactação da cromatina (Cobb & Handel, 1998; Schulz *et al.*, 2010). Posteriormente, são formados os espermatócitos secundários ($SPTC_2$), os quais passarão pela segunda divisão meiótica produzindo as espermatídes ($SPTD$).

A espermiogênese consiste em uma série de alterações morfológicas que levam à diferenciação das $SPTD$ em espermatozóides ($SPTZ$), com variações entre as espécies quanto ao modo de condensação da cromatina, eliminação de corpos residuais, formação da peça intermediária e do flagelo (Jamieson, 1991). No final da espermiogênese, as pontes citoplasmáticas entre as $SPTD$ são rompidas, ocorre a ruptura dos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli e os $SPTZ$ são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos durante a espermição (Batlouni *et al.*, 2009; Schulz & Nóbrega, 2011a). Os cistos de espermatídes podem ser eventualmente liberados no lúmen dos túbulos seminíferos de algumas espécies de peixes, onde o processo de espermiogênese é finalizado (Mattei *et al.*, 1993; Magalhães *et al.*, 2011).

1.2. Histofisiologia testicular de peixes

A espermatogênese é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada, sendo que os estímulos ambientais (ex: chuva, fotoperíodo e temperatura) atuam no hipotálamo estimulando a produção de fatores liberadores de hormônios gonadotróficos (GnRH) em teleósteos (Zohar *et al.*, 2010). Os GnRH induzem a hipófise a produzir e liberar gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), que atuam estimulando a biossíntese de esteróides sexuais nos testículos (Weltzien *et al.*, 2004). Sob a indução do FSH e LH, as células de Leydig transformam o colesterol em pregnenolona, a qual é convertida em 17α -hidroxiprogesterona (17α P), atuando como substrato para produção dos andrógenos, estrógenos e progestinas (Schulz & Nóbrega, 2011b) (Figure 1).

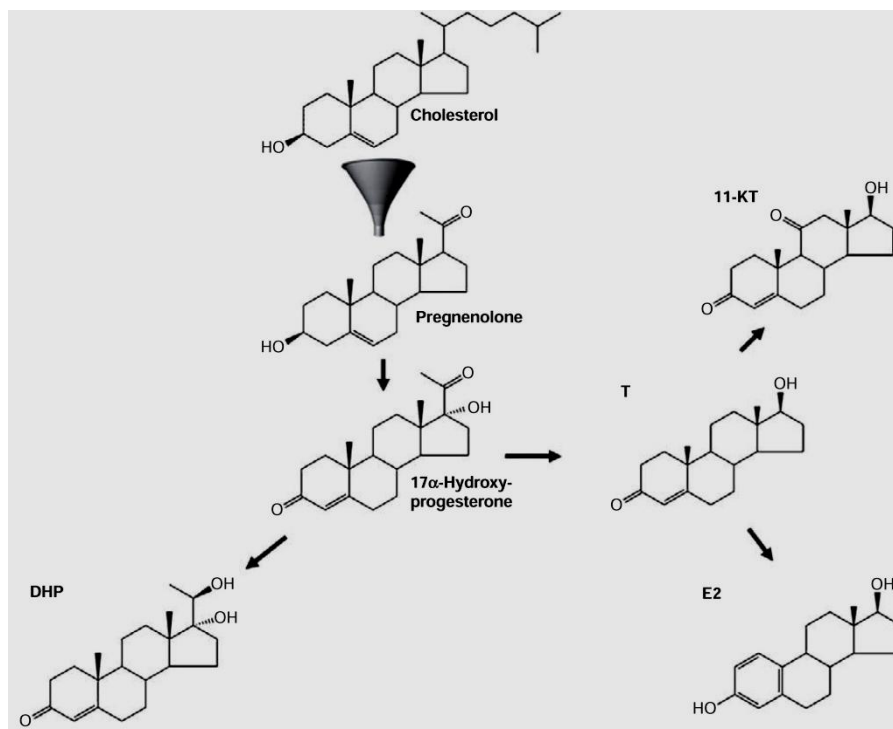


Figure 1 - Vias de produção de esteróides sexuais em células de Leydig de peixes (Schulz & Nóbrega, 2011b).

Os esteróides sexuais mostram mudanças durante o ciclo reprodutivo, desempenhando papéis distintos no controle da espermatogênese dos peixes (Figura 2). Sob a influência do FSH, o 17α P é convertido em testosterona (T), o qual posteriormente atua como substrato para produção de 11-ketotestosterona (11-KT), sendo ambos andrógenos responsáveis pela maturação testicular atuando principalmente na divisão mitótica das espermatogônias e na espermiacção (Haider, 2007; Ohta *et al.*, 2007; de Waal *et al.*, 2009).

A testosterona pode ser convertida também em 17β -estradiol (E2) pela enzima P450 aromatase nas células de Leydig sob a influência do FSH. Estudos mostram que E2 atua principalmente na proliferação e auto-renovação de espermatogônias (Miura *et al.*, 1999; Amer *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2003), e também participa na indução da proliferação de células de Sertoli em testículos espermiados (Chaves-Pozo *et al.*, 2007). A elevação dos níveis de T e E2 durante a maturação das células germinativas inibe a síntese e a liberação de FSH pela hipófise.

Em fases tardias da espermatogênese o LH é mais ativo que o FSH, estimulando as células de Leydig a produzir 17α P, que é convertida pela enzima 20α hidroxidrogenase em 17α - 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP). O DHP é responsável pela diferenciação e maturação dos espermatócitos, hidratação, mobilidade e capacitação dos espermatozoides no ducto espermático para fertilização (Nagahama, 1994; Yamada *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2010) e pode também atuar na fase espermatogonial (Miura *et al.*, 2006).

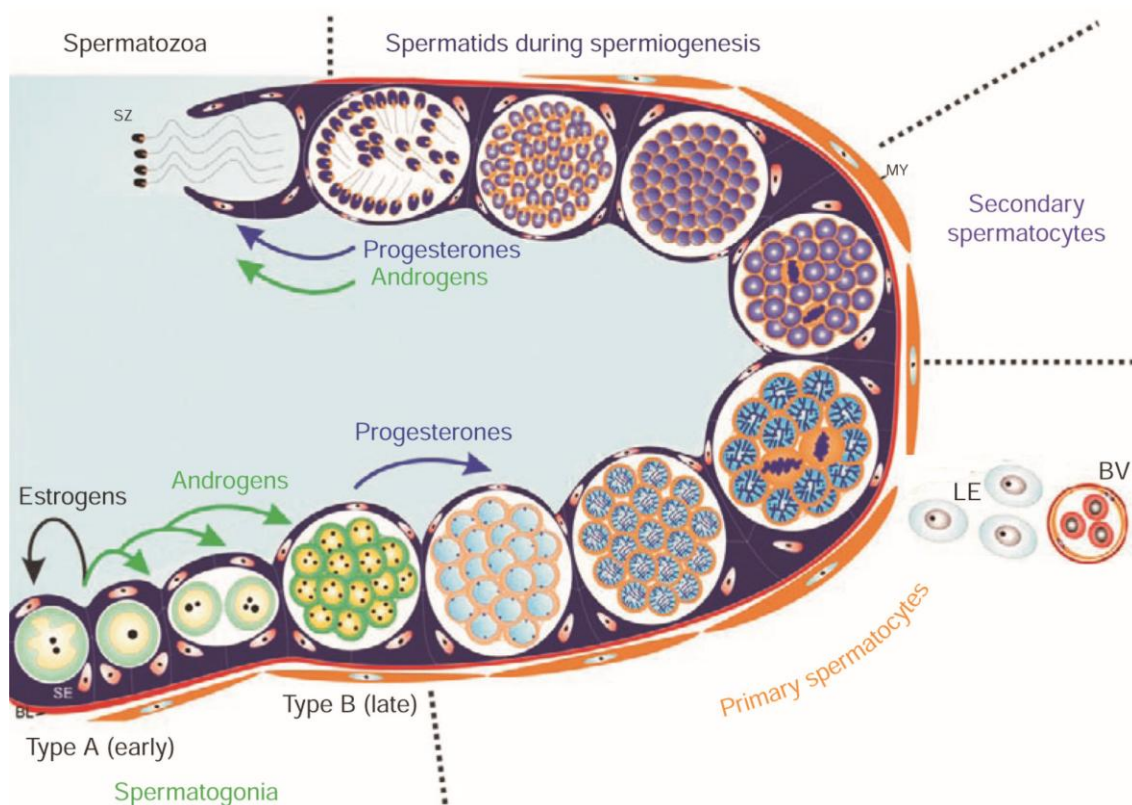


Figura 2 - Atuação dos esteroides sexuais nas diferentes fases da espermatogênese. **Se** - Células de Sertoli; **BL** - Membrana basal; **LE** - Células de Leydig; **BV** - Vasos sanguíneos; **MY** - Células mioídes; **SZ** - espermatozoides (Schulz & Nóbrega, 2011b).

1.3. Proliferação e morte celular em testículos de teleósteos

Em teleósteos, a homeostase tecidual e a progressão da espermatogênese são garantidas pelo balanço entre a proliferação e a morte das células germinativas e somáticas durante o desenvolvimento testicular (Krumchnabel & Podrabsky, 2009).

Os primeiros estudos sobre a proliferação celular utilizaram basicamente dois métodos de avaliação: contagem de figuras de mitose em cortes histológicos utilizando a morfologia como parâmetro de identificação (Beaumont & Mandl, 1962) e contagem após a incorporação de marcadores como a timidina triada e o BrdU (Dolbeare, 1995). Outro método de marcação de células em proliferação é o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) descrito por Miyachi *et al* (1978). O PCNA é uma proteína nuclear não-histônica que apresenta 36 kDa em mamíferos (Bravo & Graf, 1985; Bravo & MacDonald-Bravo, 1987). O PCNA é um importante regulador do ciclo celular, muito conservado entre as espécies. Atua como co-fator da DNA-polimerase delta e está envolvido nos processos de reparo de DNA, tendo relação linear com a incorporação de timidina em muitos tecidos normais (Bravo *et al.*, 1987; Hall & Woods, 1990). O PCNA é um excelente marcador molecular de células em proliferação, sendo utilizado em diversos estudos cíclicos da espermatogênese de peixes (Miura *et al.*, 2002; McClusky, 2005; Corriero *et al.*, 2007; Loppion *et al.*, 2008). Na maioria dos teleósteos o crescimento do testículo é contínuo, podendo acompanhar o aumento do peso corporal, sendo que a proliferação das células de Sertoli ocorre preferencialmente associada a cistos de espermatogônias (Koulish *et al.*, 2002; Schulz & Miura, 2002; Schulz *et al.*, 2005). O arranjo cístico da espermatogênese em peixes possibilita maior suporte às células germinativas pelas células de Sertoli, resultando em eficiente produção espermática que é garantida pela disponibilidade de fatores regulatórios e pelo baixo número de células em apoptose (Nóbrega *et al.*, 2009).

A apoptose é um processo fisiológico que mantém o número apropriado de células no tecido (Kerr *et al.*, 1972), morfológicamente é caracterizada pela perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, retração celular, condensação da cromatina associada próximo ao envoltório nuclear e fragmentação celular em corpos apoptóticos que são fagocitados por células vizinhas, sem desencadear reação inflamatória (Baum *et al.*, 2005). A apoptose desempenha papel crucial no desenvolvimento normal das células germinativas e pode ocorrer espontaneamente ou por meio do desencadeamento de vários fatores, incluindo estímulos hormonais, estresse térmico e metais pesados (Hikim & Swerdloff, 1999; Andreu-Vieyra *et al.*,

2005). A apoptose é altamente conservada durante a evolução e requer uma maquinaria especializada ativada por vias extrínsecas e/ou intrínsecas, envolvendo proteínas da família Bcl-2, via Fas, p53 e caspases (Baum *et al.*, 2005; Takle & Andersen, 2007; Tripathi *et al.*, 2009) (Figura 3). Um dos componentes-chave na maquinaria apoptótica é a cascata de proteases de cisteínas, conhecidas como caspases (Takle & Andersen, 2007). Estas enzimas estão atualmente categorizadas em caspases iniciadoras -2, -8, -9 e -10 e efetoras -3, -6 e -7 (Fischer *et al.*, 2005).

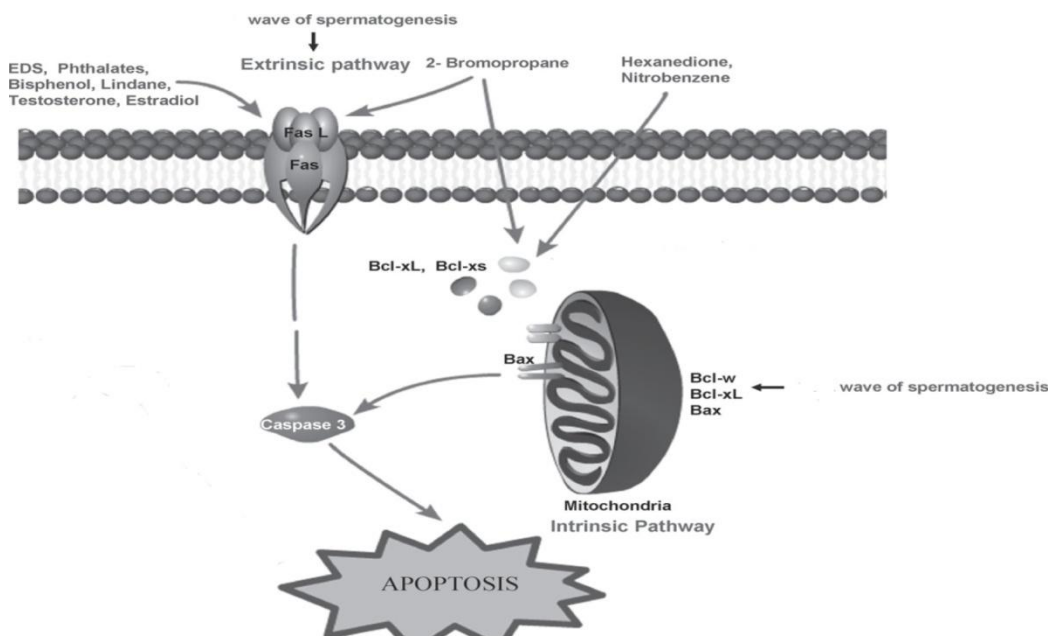


Figura 3 - Vias apoptóticas induzidas por toxinas durante a espermatogênese (Tripathi *et al.*, 2009).

O aumento significativo de apoptose foi utilizado como biomarcador de impacto ambiental em peixes expostos a diferentes tipos de xenobióticos que prejudicam desde a função hepática até a taxa reprodutiva de peixes (Janz *et al.*, 1997, 2001; Piechotta *et al.*, 1999; Weber & Janz, 2001, Weber *et al.*, 2002). Especificamente, a expressão da caspase-3 foi avaliada durante o desenvolvimento de células germinativas em testículos de peixes submetidos experimentalmente a diferentes estressores ambientais (Ito *et al.*, 2003; Migliarini *et al.*, 2005; McClusky *et al.*, 2008). Em teleósteos, a apoptose testicular é observada durante as três fases da espermatogênese e sua predominância ocorre principalmente na fase espermatogonial, mas, variações podem ocorrer dependendo da espécie, idade, período reprodutivo e condições ambientais (Chaves-Pozo *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2005; Corriero *et al.*, 2007; Alvarenga & França, 2009; Domingos *et al.*, 2012). Em geral, as células de Sertoli fagocitam os corpos apoptóticos liberados durante o processo espermatogênico.

1.4. Proteínas de choque térmico

Os peixes são altamente susceptíveis às alterações ambientais e as proteínas de choque térmico (HSP's) que desempenham um papel central na homeostase celular. As HSP's são conservadas durante a evolução e tradicionalmente são agrupadas em famílias de acordo com o peso molecular: alto peso molecular (100-110 kDa), HSP90 (85-90 kDa) e HSP70 (68-73 kDa) e baixo peso molecular (16-47 kDa) (Morimoto, 1998). Os genes de codificação das HSP's podem ser agrupados em três classes: 1) constitutivamente expressos durante o crescimento e desenvolvimento, 2) constitutivamente expressos e induzidos e 3) estritamente induzidos (Currie, 2011).

As HSP's expressas constitutivamente funcionam como chaperonas moleculares que se ligam transitariamente aos polipeptídios na síntese proteica, permitindo que as proteínas organizem-se de forma correta e/ou atuem promovendo o desdobraimento de proteínas que se organizaram de maneira incorreta (Kiang & Tsokos, 1998; Basu *et al.*, 2002). Desta forma, as HSP's participam da manutenção, síntese e maturação de diversas proteínas garantindo o correto funcionamento do organismo. Em todos os organismos, a resposta ao choque térmico é mediada por uma família de fatores de transcrição de choque térmico (HSF's) que são codificados por quatro genes (HSF-1, HSF-2, HSF-3 e HSF-4), sendo o mais comum o HSF-1 que codifica a proteína HSF1 em células eucariotas (Currie, 2011) (Figura 4).

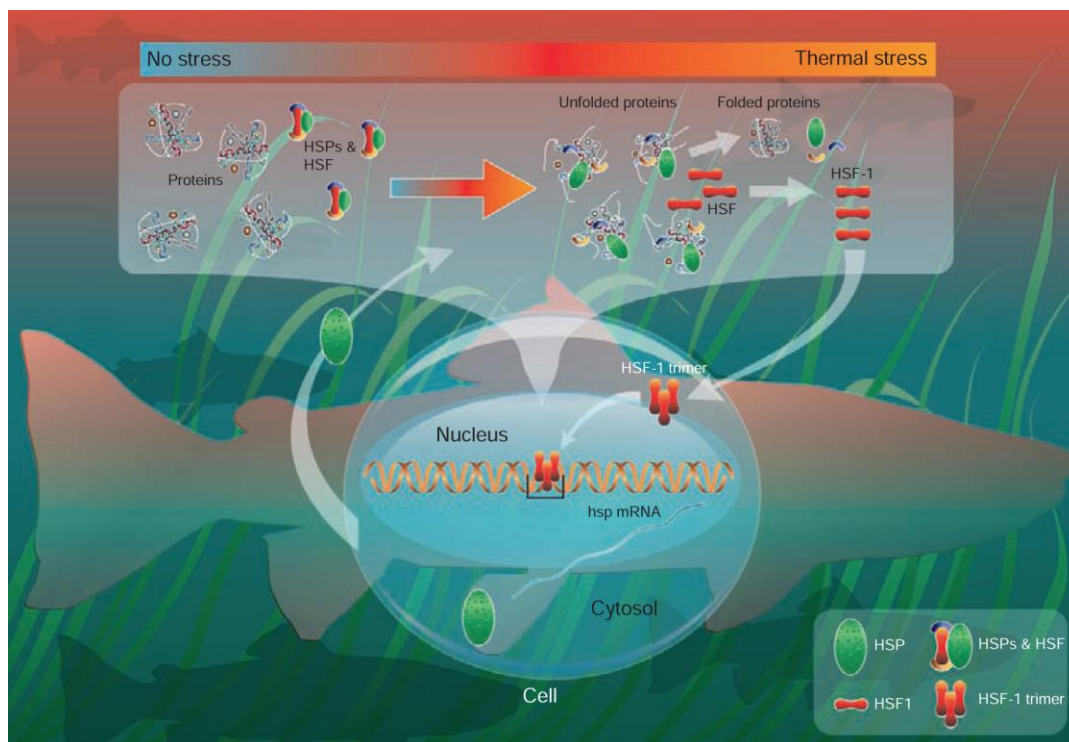


Figura 4 - Regulação molecular de indução de HSP's em peixes (Currie, 2011).

Em condições normais, HSP's são transitoriamente associadas às HSF's. Por outro lado, durante o estresse térmico, as proteínas podem se desdobrar e os agregados do processo desencadeiam a liberação das HSP's do HSF's. Os monômeros de HSF livres se movem para o núcleo da célula onde rearranjam em trímeros, atuando em regiões específicas do DNA, resultando na transcrição e subsequente tradução de genes de choque térmico (Currie, 2011).

Dentre as diferentes HSP's, a HSP70 é a mais estudada e tem papel essencial na resposta celular do organismo, sendo expressa de forma constitutiva para manter as condições fisiológicas das células (Feder & Hofmann, 1999; Deane & Woo, 2011). No entanto, a expressão de HSP70 é rapidamente induzida quando as células são expostas a agentes estressores, tais como: variações bruscas de temperatura e oxigênio, exposições a poluentes industriais e agrícolas (Weber & Janz, 2001; Porter & Janz, 2003). Nestas condições, a HSP70 atua impedindo a desnaturação de proteínas e inibindo ou promovendo a apoptose (Carnevali & Maradonna, 2003; Parcellier *et al.*, 2003). Em mamíferos, as HSPs são importantes para o desenvolvimento testicular e a atividade da HSP70 como chaperona é necessária em diferentes fases de espermatogênese (Sarge & Cullen, 1997; Eddy, 1999; Kamaruddin *et al.*, 2004; Volpe *et al.*, 2008). Em peixes teleósteos, a expressão de HSP70 foi investigada em diferentes tecidos como o cérebro, brânquias, fígado e ovários apenas sob condições de estresse (Yoo & Janz, 2003; Wang *et al.*, 2007; Padmini & Rani, 2008).

A correlação entre a expressão de HSP70 e apoptose em peixes, submetidos experimentalmente a agentes tóxicos e a variações de temperatura, foi reportada em diversos estudos (Weber & Janz, 2001; Porter & Janz, 2003; Delaney & Klesius, 2004; Migliarini *et al.*, 2005). O impacto ambiental de um estuário contaminado por efluentes industriais refletiu em maior expressão de HSP70 nos hepatócitos do teleósteo *Mugil cephalus* em relação a outro estuário sem efluentes (Padmini & Rani, 2008). Em testículos do teleósteo *Gobius niger*, expostos a altas concentrações de cádmio *in situ*, ocorreu aumento significativo da expressão de HSP70 e do processo apoptótico, indicativos de resposta ao estresse (Migliarini *et al.*, 2005).

Desta forma, peixes representam um excelente modelo para estudo da HSP70, uma vez que demonstra a resposta a diferentes agentes estressantes na natureza ou expostas a determinados estresse em condições experimentais (Deane & Woo, 2011).

1.5. Espécie de estudo

O curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829, previamente identificado como *Prochilodus marggravii* (Walbaum, 1792), foi a primeira espécie descrita da bacia do rio São Francisco (Figura 5) (Reis *et al.*, 2003; Castro & Vari, 2004). É relatada como uma das principais espécies de peixes predominantes na pesca da região de Três Marias podendo alcançar mais de 10 kg de peso corporal (Sato & Godinho, 2003). De hábito alimentar iliófago, o curimatã-pacu alimenta-se de lodo com finos materiais particulados depositados no fundo do rio, podendo ser um modelo biológico de estudo em rios impactados (Sato *et al.*, 2005; Thomé *et al.*, 2012). A espécie não desova em ambientes lênticos e é usualmente submetida à reprodução induzida na Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias visando o repovoamento do reservatório (Sato *et al.*, 1996; Arantes *et al.*, 2011b). Apresenta desova total, ovos livres, desenvolvimento embrionário rápido e não possui comportamento de cuidado parental (Sato *et al.*, 1996). Realiza migrações reprodutivas no período chuvoso, geralmente de novembro a fevereiro, no rio São Francisco e em seus afluentes, principalmente no rio Abaeté (Sato & Godinho, 2003).



Figura 5 - Exemplo de curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* do rio São Francisco (barra = 2cm).

1.6. O rio São Francisco e a área de estudo

A bacia hidrográfica do rio São Francisco abrange uma área de 645.067km² percorrendo 2700 km inteiramente em território brasileiro. O rio São Francisco nasce no Chapadão dos Zagaiais, na região da Serra da Canastra no sudoeste do Estado de Minas Gerais, a 1.450 m de altitude. Durante seu percurso, o rio drena o Distrito Federal e os

Estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Sergipe e Alagoas até sua foz no oceano Atlântico e participa da formação de três biomas: Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (Godinho & Godinho, 2003). Segundo a divisão do Plano Diretor para o Desenvolvimento do Vale do São Francisco (PLANVASF), baseado nas características fisiográficas, a bacia do rio São Francisco é compartimentada em quatro grandes áreas: Alto (desde a nascente até a cidade de Pirapora, MG), Médio (de Pirapora a Remanso, BA), Submédio (de Remanso a Paulo Afonso, BA) e Baixo (de Paulo Afonso ao Oceano Atlântico) (Patrus *et al.*, 2001). Na região do Alto do São Francisco, o rio apresenta águas rápidas, frias e oxigenadas até o reservatório da usina hidrelétrica de Três Marias (UHE-TRM), que foi construído em 1961 para fins de produção de energia elétrica, irrigação, navegação, regularização do rio e controle de cheias (Sampaio & Sato, 2006). O reservatório da UHE-TRM possui 100 mil hectares de área inundada, $21 \times 10^9 \text{ m}^3$ de água com profundidade que ultrapassa 60 m no canal do rio, sendo considerado um dos mais antigos dos grandes reservatórios brasileiros (Esteves *et al.*, 1985; Sampaio & López, 2003). Durante os meses de novembro a fevereiro (período chuvoso), o reservatório da UHE-TRM apresenta estratificação térmica, com temperatura de 2 a 3°C mais fria no hipolímnio em relação ao epilímnio. Esta água mais fria e pobre em oxigênio é lançada no rio São Francisco, a jusante da barragem (18°11'S, 45°14'W), inibindo a reprodução das principais espécies de importância econômica nos primeiros 34 km após a barragem (Sato & Godinho, 2003; Sato *et al.*, 2005). Nesse ponto (S1), o rio apresenta somente pequenos tributários (ribeirões e córregos) que não reestabelecem o perfil físico-químico da água (Figura 6).

O rio Abaeté é o primeiro tributário de médio porte que deságua a cerca de 34 km após a UHE-TRM (18°02'S, 45°11'W) com uma área de drenagem de 5.825 km². Da confluência do rio São Francisco com o rio Abaeté até a barra do rio de Janeiro, 54 km após a barragem (S2), o rio São Francisco apresenta condições favoráveis à reprodução de várias espécies de peixes migradores de importância econômica, tais como: o dourado (*Salminus franciscanus*), piauí verdadeiro (*Leporinus elongatus*), surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) e os curimatãs (*P. argenteus* e *P. costatus*) (Sato & Godinho, 2003; Sato *et al.*, 2005).

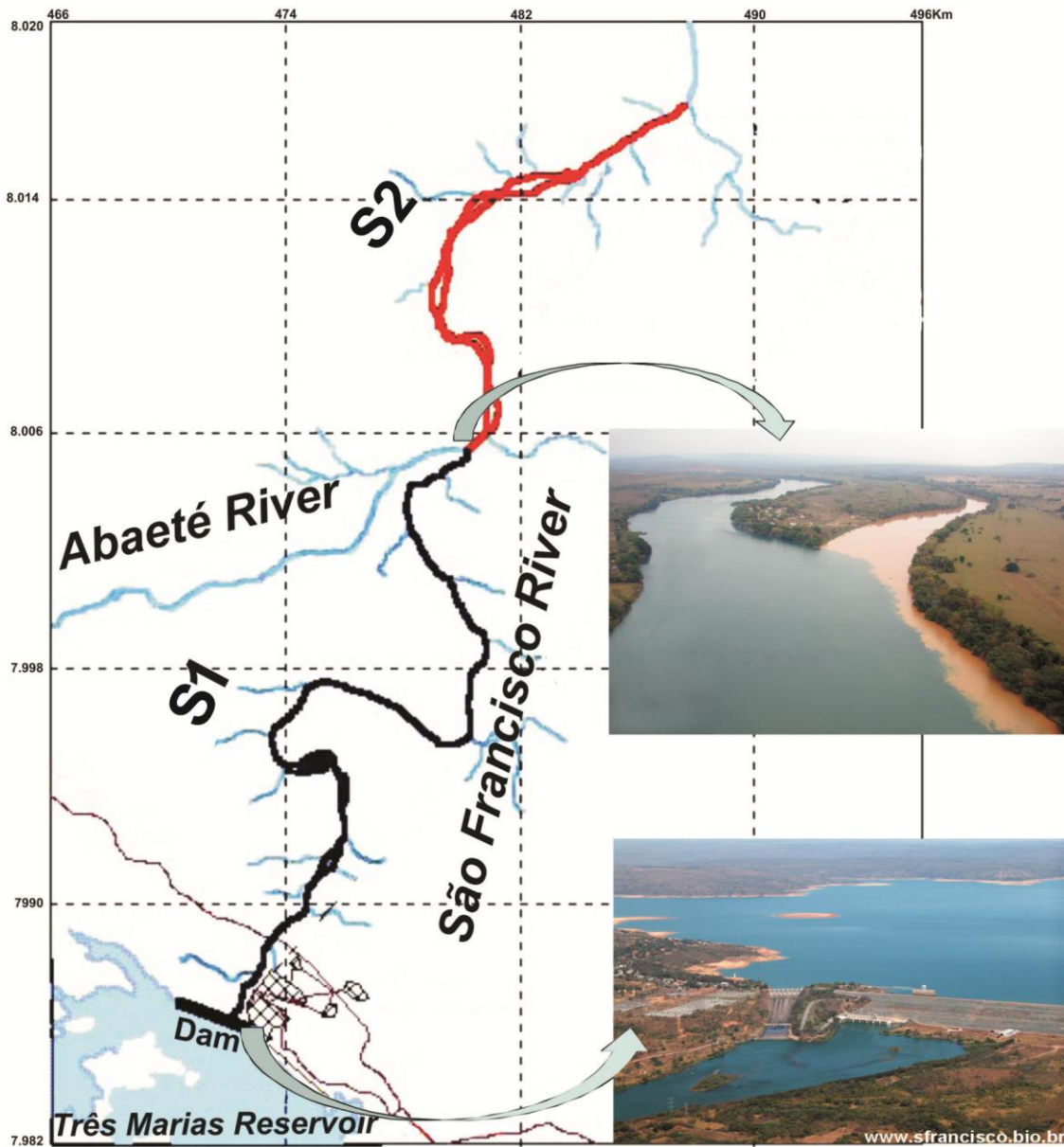


Figura 6 - Localização dos pontos de estudo no rio São Francisco a jusante da barragem de Três Marias. **S1** - Imediatamente após a barragem de Três Marias. **S2** - Após a confluência com o rio Abaeté (margem esquerda).

2. Justificativa e Objetivos

O barramento de rios com a construção de reservatórios é hoje uma prática indispensável no país para a geração de energia elétrica e controle de cheias. Os impactos decorrentes das modificações hidrológicas impostas pelo represamento de rios dependem da natureza, intensidade e peculiaridades da fauna local tais como: estratégias reprodutivas, padrões de migrações, especializações tróficas e grau de pré-adaptações comportamentais a ambientes lacustres (Agostinho *et al.*, 2007). Vários impactos têm sido descritos sobre a comunidade de peixes a jusante de barramentos hidroelétricos como: isolamento de populações, aumento da vulnerabilidade à predação, alterações das áreas de alimentação e recrutamento de alevinos, mudança de comportamento, interrupção da rota migratória, redução dos estoques pesqueiros, dentre outros (Agostinho *et al.*, 1993; Sato & Godinho, 2003; Agostinho *et al.*, 2007). Em ambientes tropicais, um dos principais impactos sobre a reprodução de peixes é a interrupção da migração para a desova que afeta o recrutamento de novos indivíduos (Sato *et al.*, 2005; Agostinho *et al.*, 2007).

Na região de Três Marias, estudos prévios demonstraram que a água liberada nos primeiros 34 km do rio São Francisco a jusante do barramento hidrelétrico, apresenta condições desfavoráveis que afetam negativamente a reprodução de peixes migradores (Sato & Godinho, 2003). Neste ponto, observou-se que fêmeas de *P. argenteus* apresentam baixos níveis plasmáticos de esteroides sexuais que refletem em disfunção da maturação ovariana com o aumento da atresia folicular, redução da fecundidade e ausência de desova (Sato *et al.*, 2005; Arantes *et al.*, 2010; Thomé *et al.*, 2012). Em relação aos machos, nenhum estudo detalhado sobre a espermatogênese e os níveis plasmáticos de esteróides sexuais foi conduzido com peixes do rio São Francisco.

No Brasil, poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar parâmetros e metodologias adequadas para a avaliação da espermatogênese em condições ambientais. Dentre os parâmetros importantes para a avaliação do processo espermatogênico, podemos destacar a proliferação e a morte celular, cujo balanço garante a homeostase tecidual e uma eficiente produção espermática. Neste sentido, PCNA, TUNEL e caspase-3 têm sido utilizados como ferramentas em estudos da espermatogênese de peixes (Corriero *et al.*, 2007; Loppion *et al.*, 2008; McClusky *et al.*, 2008). Além disso, os peixes representam um excelente modelo para o estudo da expressão de proteínas de choque térmico (HSP's), sendo a HSP70 a mais estudada em resposta a diferentes agentes estressantes na natureza ou em condições experimentais.

Desta forma o objetivo do presente estudo foi avaliar a espermatogênese, os níveis plasmáticos de esteróides sexuais, os níveis proteicos de HSP70 e PCNA, bem como a apoptose durante o ciclo reprodutivo de *P. argenteus* em dois pontos do rio São Francisco, a jusante da barragem de Três Marias. Neste sentido, o trabalho foi dividido em três partes, com os seguintes objetivos específicos:

- Comparar a proliferação e morte celular durante a espermatogênese e os níveis plasmáticos de T, E2 e 17- α P em relação às mudanças cíclicas da atividade testicular em dois pontos do rio São Francisco, a jusante da barragem de Três Marias (**artigo 1**).
- Investigar o envolvimento de HSP70 na apoptose e proliferação celular em diferentes fases de maturação testicular de *P. argenteus* no rio São Francisco (**artigo 2**).
- Avaliar os níveis proteicos de HSP70 e caspase-3 como biomarcadores de impacto ambiental em testículos e fígado de *P. argenteus* em dois pontos do rio São Francisco, a jusante da barragem de Três Marias (**resultados complementares**).

3. Material e Métodos

3.1 Amostragens dos peixes

Para a realização do presente estudo foram utilizados machos adultos de *P. argenteus* capturados no rio São Francisco, a jusante da barragem de Três Marias. Na primeira etapa foram utilizados 257 exemplares (S1 = 114 exemplares e S2 = 143 exemplares) capturados nos meses de maio, agosto e novembro de 2005 e fevereiro de 2006. Na segunda etapa, 48 exemplares foram capturados em S2 (após a confluência com o rio Abaeté) em quatro amostragens (junho, setembro e dezembro de 2008 e março de 2009). Na terceira etapa, os peixes ($n = 20/\text{ponto}/\text{período}$) foram capturados em dois períodos distintos do ciclo hidrológico do rio São Francisco nos anos de 2008 e 2009: junho e agosto (pico do período seco) e dezembro e janeiro (pico do período chuvoso).

As capturas foram realizadas pela equipe de pesca da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (CEMIG GT/CODEVASF), utilizando-se diferentes petrechos de pesca. Em campo, os peixes foram sacrificados por secção da medula espinhal seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, <http://www.cobea.org.br>). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA protocolo nº: 073/08) da UFMG. De cada exemplar, obtiveram-se comprimento total (CT), peso corporal (PC) e peso das gônadas (PG), e os dados foram utilizados para o cálculo do índice gonadossomático ($IGS=100 \times PG/PC$) e do fator de condição de Fulton ($K = 100 \times PC/CT^3$). Avaliação da atividade reprodutiva de machos de *P. argenteus* baseou-se nas características macroscópicas dos testículos que variou de acordo com o volume, coloração, irrigação sanguínea, turgidez e período de coleta (figura 7).

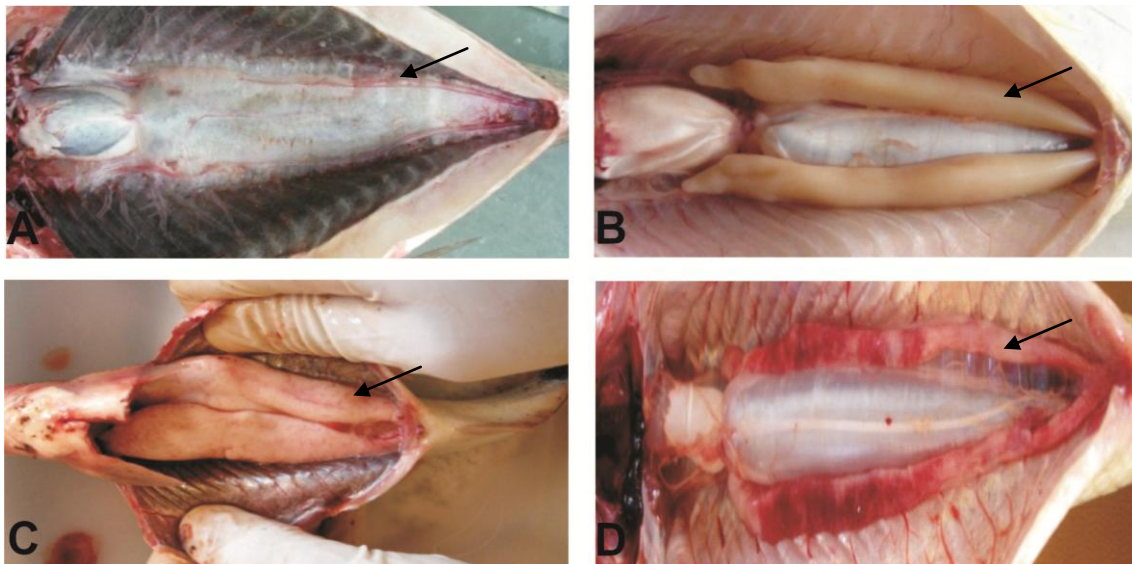


Figura 7 - Características macroscópicas de testículos (seta) de *P. argenteus* em diferentes estádios de maturação. **A:** Repouso (testículos finos e translúcidos); **B:** Maturação (testículos volumosos e esbranquiçados); **C:** Maduros (testículos túrgidos e de cor branco-leitosa); **D:** Espermiado (testículos flácidos e com áreas hemorrágicas).

3.2. Parâmetros físico-químico da água

Os principais parâmetros físico-químicos da água (temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, pH e condutividade) foram registrados pela manhã durante as amostragens de peixes, utilizando-se um verificador de qualidade de água portátil Horiba modelo U-10. A transparência da água foi medida pela profundidade do disco Secchi.

3.3 Níveis de esteróides sexuais

Amostras de sangue (1,0 a 1,5ml) obtidas por punção da veia caudal foram centrifugadas durante 15min a 800rpm. Alíquotas de soro foram armazenadas a -20°C para a determinação das concentrações de T, E2 e 17- α P. As concentrações de T foram determinadas por quimioluminescência com o teste de Centaur testosterona ADVIA (Bayer Corporation, Tarrytown, New York, EUA). Os níveis de E2 foram determinados por imunofluorimetria indireta usando Estradiol AutoDELFIA[®] teste (Perkin Elmer Waltham, Massachusetts, EUA). Radioimunoensaio em fase sólida foi usado para 17- α P por meio do kit Coat-A-Count progesterona 17 α -OH – DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, Califórnia, EUA). Paralelismos das curvas de diluição das amostras de plasma sanguíneo com a curva padrão foram demonstrados em todos os ensaios, com coeficientes de correlação que variam entre 0,947-0,999. Os coeficientes

inter e intraespecífico variaram de 7 a 10% para T, 5 a 8% para E2 e 8 a 10% para 17- α P. A reação cruzada do ensaio T foi menor do que 6% para outros andrógenos e menos de 2% para 11-KT. Para E2 e 17- α P, a reação cruzada para outros estrógenos ou DHP foi menor que 4% e 1% respectivamente. A sensibilidade dos ensaios foi de 5 pg/ml.

3.4. *Microscopia de luz*

Para histologia, amostras da região média dos testículos foram fixadas em líquido de Bouin por 8h em temperatura ambiente, embebidas em parafina, seccionadas com 4 e 5 μ m de espessura e coradas com hematoxilina e eosina.

3.5. *Reação de TUNEL in situ*

Amostras de testículos foram fixadas em líquido de Bouin, incluídas em parafina, seccionadas com 5 μ m de espessura e submetidas à técnica de TUNEL *in situ* (kit QIA 33 TdT-FragEL DNA fragmentation, Calbiochem) seguindo o protocolo do fabricante. Para a permeabilização e inativação de peroxidase endógena as secções foram tratadas com proteinase K(10 μ g/ml) e água oxigenada 3%, respectivamente, antes da reação. As secções histológicas foram incubadas com mistura TdT (enzima terminal deoxynucleotides transferase) e deoxinucleotídeos conjugados com biotina em câmara úmida a 37°C por 1h e 30min. Em seguida, aplicou-se solução de estreptavidina conjugada com peroxidase em câmara úmida a temperatura ambiente por 45min. A reação da peroxidase foi revelada com diaminobenzidina (DAB) durante 2min em temperatura ambiente e as secções foram contra-coradas com hematoxilina. Para controle-negativo, uma das lâminas não recebeu a mistura contendo a enzima TdT e deoxinucleotídeos. Foram consideradas células apoptóticas as que apresentaram reação TUNEL-positiva e pelo menos duas das seguintes características: condensação periférica da cromatina em forma de grumos, retração citoplasmática e fragmentação semelhante a corpo apoptótico.

3.6. *Imunohistoquímica*

Amostras de testículos fixadas em líquido de Bouin, incluídas em parafina e seccionadas com 5 μ m de espessura foram utilizadas para a detecção de HSP70 (anticorpo monoclonal de camundongo, clone BRM-22, H 5147 Sigma-Aldrich Inc.) e PCNA (anticorpo monoclonal de camundongo, clone PC-10, Santa Cruz Biotechnology). Para a reativação antigênica utilizou-se tampão citrato pH 6,0 a 95°C

por 30min. Para bloqueio de reações inespecíficas e da peroxidase endógena foram utilizados BSA 2% e água oxigenada 3%, respectivamente, antes da reação imunohistoquímica. As secções histológicas foram incubadas com anticorpo primário “overnight” a 4°C, nas diluições de 1:80 para HSP70 e 1:100 para PCNA. Como sistema de revelação secundário utilizou-se o kit da Dakocytomation LSAB (anticorpo secundário de cabra conjugado com biotina e estreptavidina conjugada com peroxidase), sendo as marcações visualizadas com DAB e contra-coradas com hematoxilina. Para controle-negativo, uma das lâminas não recebeu o anticorpo primário.

3.7. *Western blotting*

A especificidade dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica foi determinada por Western-blotting. Para isso, amostras congeladas de testículo foram sonicadas em tampão de lise com inibidores de protease. A solução obtida foi centrifugada a 120.000g durante 30min. O sobrenadante contendo as proteínas foi adicionado ao gel de eletroforese 12% e, posteriormente, transferido para membrana de nitrocelulose. Após transferência, as reações inespecíficas foram bloqueadas com BSA 1%. A membrana foi incubada no Snap-id system durante 20 min com um dos anticorpos primários (HSP70, 1:500; PCNA, 1:300). Após três lavagens com PBS contendo Tween 20, a membrana foi incubada durante 10min com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (IgG Sigma, 1:500). A reação foi revelada pelo DAB diluído em PBS contendo cloronaftol, metanol e água oxigenada. Todos os testes foram feitos em triplicatas.

3.8. *ELISA para HSP70*

Níveis de HSP70 em testículos foram avaliados utilizando-se o kit HSP70 total DuoSet IC (R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemanha). Amostras congeladas de testículos foram homogeneizadas em tampão de lise com inibidores de protease. A solução da amostra foi centrifugada a 14.000g durante 20min a 4°C e os sobrenadantes foram congelados a -70°C. Posteriormente, placas de 96 poços foram incubadas com anticorpo de captura “overnight” em temperatura ambiente, seguido por três lavagens e incubação com as soluções das amostras por 2h em temperatura ambiente. Após a lavagem, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção HSP70 durante 2h e, em seguida, com estreptavidina conjugada com peroxidase durante 20min. A reação foi desenvolvida com a solução de substrato (H₂O₂ e tetrametilbenzidina) e bloqueada com

adição de 0,05 ml de solução 2N H₂SO₄. A absorbância foi obtida a 450nm. Em cada placa, uma curva padrão de HSP70 recombinante foi obtida e alguns poços sem a aplicação da solução das amostras foram separados para controle negativo. Os níveis proteicos de HSP70 em testículos foi obtida por meio da dosagem de proteína total da amostra e os valores foram expressos em ng de HSP70/mg de proteína total (Bradford, 1976).

3.9. *Teste colorimétrico para caspase-3*

A atividade enzimática da caspase-3 em testículos foi avaliada utilizando-se o teste colorimétrico para caspase-3 da R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Alemanha). Amostras do tecido foram pesadas e lisadas com 0,5ml do tampão de lise. Os homogeneizados foram centrifugados a 20.000 g durante 30 min e o sobrenadante foi incubado com o substrato para caspase-3 (DEVD-pNA) a 37°C por 2h. A absorbância de cada amostra foi registrada a 405nm e o nível da atividade da caspase-3 foi diretamente proporcional à reação de cor.

3.10. *Morfometria*

Na primeira etapa, a espermatogênese de peixes capturados em S1 e S2 foi comparada em testículos maduros (15 peixes/ponto) durante o pico do período reprodutivo (novembro e fevereiro). Células germinativas foram identificadas utilizando-se o diâmetro nuclear e a organização da cromatina como descrito por Schulz *et al.*, (2010). O diâmetro dos túbulos seminíferos foi determinado pela média dos diâmetros maior e menor de cada túbulo e o número de cistos germinativos foi também obtido em cada túbulo usando o software de análise de imagem KS 400 Zeiss. Em ambos os parâmetros, 15 secções transversais de túbulos seminíferos foram examinados para cada peixe com ampliação de 400x, totalizando 225 túbulos analisados em cada ponto do rio. A proporção volumétrica (%) das células somáticas e germinativas foi determinada com auxílio de uma grade de 441 pontos equidistantes acoplada à ocular do microscópio de luz. Para cada lâmina, 15 áreas foram escolhidas aleatoriamente e examinadas com ampliação de 400x, totalizando 225 campos histológicos analisados por ponto do rio. Células mióides, tecido conjuntivo e células do sistema imunológico foram agrupadas e artefatos (espaços de retração das células) foram também considerados no número total de pontos utilizados para obter as porcentagens.

Na segunda etapa, foram utilizados 10 peixes de cada período de amostragem. O

diâmetro nuclear das células germinativas foi medido em 150 células de cada fase da espermatogênese com ampliação de 1000x. As porcentagens de cistos ou células germinativas e células de Sertoli positivas para HSP70, PCNA e TUNEL foram calculadas em 15 campos de 100 μm^2 escolhidos aleatoriamente para cada peixe, totalizando 150 campos/período e examinadas em aumento de 400x. O total de células positivas para PCNA foi também calculado em cada período de amostragem.

3.11. Análise estatística

Os testes estatísticos e os gráficos foram realizados nos softwares GraphPad InStat e Prism, respectivamente. Dados apresentados em figuras e tabelas foram expressos em média \pm erro padrão (EP) ou desvio padrão (DP), com um nível de significância de $p < 0,05$. As comparações dos dados obtidos nos dois pontos do rio São Francisco foram realizadas usando o teste t de Student, com ou sem correção de Welch. As variações dos índices biológicos (IGS e Fator de condição K), dos níveis hormonais e dos níveis proteicos de HSP70, PCNA e caspase-3 nos diferentes períodos de amostragens foram comparadas usando o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4. Resultados

Os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se sumarizados nos itens abaixo.

4.1. Artigo 1

Domingos, F.F.T.; Thomé, R.G.; Arantes, F.P.; Castro, A.C.S.; Sato, Y.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in an area of influence of a tributary, downstream from a hydroelectric power dam, Brazil. *Fish Physiol Biochem*, 2012.
DOI 10.1007/s10695-012-9668-3.

4.2. Artigo 2

Domingos, F.F.T.; Thomé, R.G.; Martinelli, P.M.; Sato, Y.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. Relationship among HSP70, PCNA and apoptosis in the testis of a seasonal breeding fish: A morphological and immunochemical study (***Publicado Microscopy Research and Technique***).

4.3. Resultados complementares

Os resultados obtidos referem-se aos níveis proteicos de HSP70 (ELISA) e caspase-3 (teste colorimétrico) em dois períodos distintos do ciclo hidrológico do rio São Francisco nos anos de 2008 e 2009: junho e agosto (pico do período seco) e dezembro e janeiro (pico do período chuvoso).

4.1. Artigo1
(Publicado na Fish Physiology and Biochemistry)

Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in an area of influence of a tributary, downstream from a hydroelectric power dam, Brazil

Fabricio F. T. Domingos · Ralph G. Thomé ·
Fabio P. Arantes · Antonio Carlos S. Castro ·
Yoshimi Sato · Nilo Bazzoli · Elizete Rizzo

Received: 28 October 2011 / Accepted: 25 May 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract River damming and building of hydroelectric power plants interrupt the reproductive migration routes and change the major physicochemical parameters of water quality, with drastic consequences for populations of migratory fishes. The goal of this study was to evaluate proliferation and cell death during spermatogenesis and serum profiles of sex steroids in *Prochilodus argenteus*, from the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam. A total of 257 adult males were caught quarterly during a reproductive cycle in two sites: the first 34 km of the river after the dam (site 1) and the second 34–54 km after the dam (site 2), after the confluence with a tributary, the Abaeté River. Seasonal changes in the testicular activity associated with morphometric

analyses of germ cells as well as proliferation and testicular apoptosis support a more active spermatogenesis in fish from site 2, where higher levels of sex steroids and gonadosomatic index (GSI) were also found. In site 1, fish presented low serum levels of testosterone, 17β -estradiol and 17α -hydroxyprogesterone and a low GSI during gonadal maturation. Spermatogonial proliferation (PCNA) and apoptosis (TUNEL) were more elevated in fish from site 1, but spermatocytes were mainly labelled in fish from site 2. Overall, these data demonstrate changes in testicular activity and plasma sex steroids in a neotropical teleost fish living downstream from a hydroelectric dam, supplying new data on fish reproduction in regulated rivers. Moreover, morphometric analyses associated with sex steroids profiles provide reliable tools to assess fish spermatogenesis under environmental stress conditions.

F. F. T. Domingos · R. G. Thomé · F. P. Arantes ·
A. C. S. Castro · E. Rizzo (✉)
Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais
(UFMG), C. P.486, Belo Horizonte, MG 30161-970,
Brasil
e-mail: ictio@icb.ufmg.br

F. P. Arantes · N. Bazzoli
Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados,
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
(PUC Minas), Belo Horizonte, MG, Brasil

Y. Sato
Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias,
Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São
Francisco e Parnaíba (CODEVASF), Três Marias, MG,
Brasil

Keywords *Prochilodus argenteus* · Proliferation ·
Apoptosis · Sex steroids · São Francisco River

Introduction

Spermatogenesis is a cyclical process with complex interactions between somatic and germ cells, resulting in the production of spermatozoa (Schulz et al. 2010). During testicular development, tissue homeostasis and progression of spermatogenesis are ensured by a balance between proliferation and cell death. The

proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a non-histone protein of 36 kDa synthesized in G1 and S phases of the cell cycle, has been widely used in experimental studies of spermatogenesis in teleost fish (Miura et al. 2002; Lo Nostro et al. 2003; Chaves-Pozo et al. 2005). During spermatogenesis, loss of germ cells via apoptosis plays a critical role in determining spermatogenic efficiency (Baum et al. 2005; Almeida et al. 2008). Germ cell apoptosis can be triggered by hormonal and non-hormonal stimuli in different development stages, varying also in a species-specific manner (Hikim and Swerdloff 1999; Andreu-Vieyra et al. 2005).

Pituitary gonadotrophins, growth factors and gonadal sex steroids are important regulators of testicular physiology (Weltzien et al. 2004). Plasma sex steroids show cyclical changes during testicular maturation, playing distinct roles in controlling the fish's spermatogenesis (Schulz et al. 2010). Although the profiles of sex steroids are important parameters for understanding of the fish reproduction, few reports have been published on neotropical species (Barcellos et al. 2002; Marcano et al. 2007; Guerrero et al. 2009). Moreover, no detailed study on spermatogenesis and plasma levels of sex steroids in relation to testicular activity has been performed with fish exposed to environmental stress in riverine ecosystems.

The São Francisco River rises in the Canastra Hills in the state of Minas Gerais, south-eastern Brazil, flowing a distance of 2,700 km through Brazilian territory. Six major hydroelectric dams have been constructed on this river, which have mainly affected the populations of migratory fishes and reduced the fish stocks of commercially valuable species (Sato and Godinho 2003). The Três Marias hydroelectric power plant was built in 1960 with the main purposes of electricity generation and flood control. In summer, colder water and poor oxygen content from the hypolimnion of the reservoir that is released into the São Francisco River disturb the ovarian maturation and reduce the fecundity of the fish populations living downstream from the dam (Arantes et al. 2010). Approximately 34 km after the dam, the São Francisco River receives a medium-sized tributary, the Abaeté River, a rocky-bottomed river with many falls, which is considered important for fishing and spawning of migratory species (Sato et al. 2005).

The curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829 is a characiform fish that supplies

fisheries in several regions of the São Francisco River basin. It needs to perform upstream migration to spawn, and its reproduction is synchronized with the rainy season, when temperature and photoperiod are elevated (Sato et al. 2005). The species does not reproduce in the Três Marias Reservoir, and stock recovery programmes are often performed to maintain the fish population (Arantes et al. 2011a). Due to its economic importance, abundance and seasonal breeding behaviour, recent studies have been conducted to understand the general mechanisms mediating folliculogenesis and ovarian maturation under captive and natural conditions (Santos et al. 2008a, b; Thomé et al. 2009, 2010; Arantes et al. 2010, 2011a, b); however, no similar study has been conducted on males.

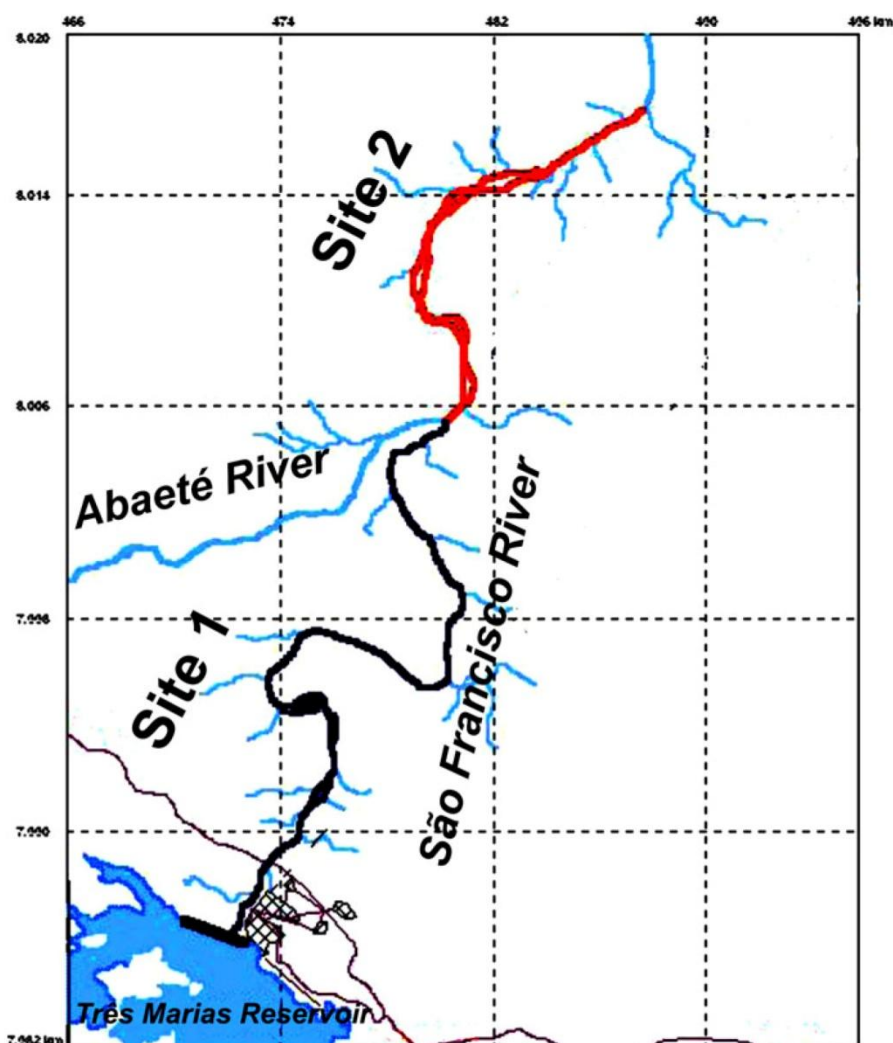
Thus, the goal of the present study was to compare proliferation and cell death during the spermatogenesis as well as serum profiles of testosterone (T), 17 β -estradiol (E2) and 17 α -hydroxyprogesterone (17- α P) in relation to the seasonal changes in testicular activity in *P. argenteus*, from two sites of the São Francisco River, upstream (site 1) and downstream (site 2), from a tributary, the Abaeté River.

Materials and methods

Stations of fish collection

Adult males of *P. argenteus* were caught in May, August and November 2005 and February 2006 in two sites on the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam (Fig. 1). From site 1, in the first 34 km of the river after the dam, and above the mouth of the Abaeté River (18°11'S, 45°14'W), a total of 114 males, with a total length (TL) and body weight (BW) of 35.14 \pm 0.46 cm and 0.60 \pm 0.03 kg (values expressed as mean \pm SEM) were caught. At site 2, located 34–54 km from the dam and below the mouth of the Abaeté River (18°02'S, 45°11'W), 143 males, with TL of 39.73 \pm 0.57 cm and BW of 0.89 \pm 0.04 kg, were caught. For each specimen, TL, BW and testicular weight (TW) were obtained to calculate the gonadosomatic index (GSI = TW \times 100/BW) and the Fulton's condition factor ($K = BW \times 100/TL^3$). For histology, samples of the middle region of the testis were fixed in Bouin's fluid for 8 h at room temperature, embedded in paraffin, sectioned at 4 μ m thickness and stained with haematoxylin–eosin. Fish

Fig. 1 Localization of sampling sites in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam in Minas Gerais, south-eastern Brazil. *Site 1*, the first 34 km of the river after the dam and above the mouth of the Abaeté River; *site 2*, located 34–54 km from the dam and below the mouth of the Abaeté River



were killed by section of the spinal cord following the ethical principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA, <http://www.cobea.org.br>). The research was approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation (CETEA) in the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil.

Water parameters

Water parameters (temperature, concentration of dissolved oxygen, pH and conductivity) were recorded during fish samplings using a Horiba device model U-10. Water transparency was measured by Secchi disc depth.

Sex steroids levels

Blood samples (1.0–1.5 mL) from each fish ($n = 40$ /site) were obtained via tail vein puncture and were centrifuged (model 80-2B—Centribio) for 15 min at 800 rpm. Serum aliquots were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for determining the concentrations of T, E2 and 17- α P. T concentrations were determined by chemiluminescence with the Testosterone ADVIA Centaur test (Bayer Corporation's, Tarrytown, New York, USA). E2 levels were determined by indirect immunofluorometric assay using Estradiol AutoDELFLIA® test (Perkin Elmer Waltham, Massachusetts, USA). For 17- α P, solid-phase radioimmunoassay was used, via the Coat-a-Count 17a-OH Progesterone—DPC Kit (Diagnostic Products Corporation's, Los Angeles,

California, USA). Parallelism of the dilution curves of the plasma samples with the standard curve was demonstrated in all assays, with correlation coefficients ranging from 0.947 to 0.999. The inter- and intra-assay coefficients of variation ranged between 7 and 10 % for T, 5–8 % for E2 and 8–10 % for 17- α P. The cross-reactivity of the T assay was < 6 % for other androgens and < 2 % for 11-ketotestosterone. For E2 and 17- α P, the cross-reaction for other estrogens and 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) was < 4 and 1 %, respectively. The sensitivity of the assays was 5 pg/mL.

Morphometry of spermatogenesis

To compare the testicular activity between fish from different sites, evaluation of the spermatogenesis was performed in mature stage (15 fish/site) during the peak of the reproductive period (November and February). Germ cells were identified using the nuclear diameter and morphological characteristics as described by Schulz et al. (2010). For the determination of the diameter of seminiferous tubules, elliptical tubular sections were chosen, long and short diameters were measured and the mean was calculated for each tubule. The number of germ cysts was also obtained in each tubule. In both parameters, 15 transversal sections of seminiferous tubules were examined for each fish at 400 \times magnification. A total of 225 tubules were analysed in each river site, using the KS 400 Zeiss image analysis software. The volumetric proportion (%) of the somatic and germ cells was scored using a 441-intersite grid placed in the ocular of the light microscope. For each slide, 15 fields were chosen randomly and examined at 400 \times magnification, totalling 225 histological fields analysed per site. Other testicular components (myoid cells, connective tissue and immune cells) were grouped. Artefacts (spaces of cell shrinkage) were considered in total number of points used to obtain the percentages.

Immunocytochemistry for PCNA

Cell proliferation during spermatogenesis was evaluated in samples of testes, in mature stage ($n = 5$ /site), fixed in Bouin's fluid and embedded in paraffin. Sections (4 μ m thickness) were incubated with 3 % hydrogen peroxide in phosphate-buffered saline (PBS)

for 30 min at room temperature, to inactivate the endogenous peroxidase, and were then treated for 30 min with 2 % bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Inc.) and 2 % goat serum to block non-specific staining. Next, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA, clone PC10 anti-mouse, Santa Cruz Biotechnology, 1:100) was applied to the sections overnight at 4 $^{\circ}$ C. After washing in PBS, the sections were incubated for 45 min with biotinylated goat anti-mouse secondary antibody (1:200, LSAB 2 System HRP, DakoCytomation Inc. Kit, Carpinteria, CA USA). Finally, the sections were treated with peroxidase-conjugated streptavidin for 45 min, revealed with 3'3 diaminobenzidine (DAB) and counterstained with haematoxylin. For antigen retrieval, the sections were boiled in 0.01 M citric acid (pH 6.0) for 20 min. The negative control was performed by excluding the treatment with primary antibody. PCNA-positive cysts of germ cells and number of labelled Sertoli and Leydig cells were quantified by an area of 100 mm² in 15 fields chosen randomly for each fish, examined at 400 \times magnification.

In situ TUNEL assay

To evaluate the testicular apoptosis, samples of testis in mature stage ($n = 5$ /site) were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin and sectioned with 4 μ m thickness. In situ TUNEL (Terminal transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling) assay, using the TdT-FragEL DNA Fragmentation Detection Kit QIA 33 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), was used following the manufacturer's protocol. Briefly, the sections were washed in Tris buffer saline pH 7.6 (TBS), treated with 10 mg/mL proteinase K in 0.01 M Tris-HCl buffer at pH 8 for 20 min and then treated with 3 % hydrogen peroxide in TBS for 30 min to inactivate endogenous peroxidase. The sections were then incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and biotinylated deoxynucleotides for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. Next, sections were incubated with peroxidase-conjugated streptavidin for 45 min at room temperature, developed with diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich Inc.) in TBS for 8 min and counterstained with haematoxylin. The negative control excluded treatment with TdT/labelled deoxynucleotides. TUNEL-positive cells were quantified by an area of 100 mm² in 15 fields chosen randomly for each fish and examined at 400 \times magnification.

Statistical analysis

Data presented in figures and tables are expressed as mean \pm standard error (SEM) or standard deviation (SD), with a significance level of $p < 0.05$. Comparisons of the means of morphometric data between river sites were analysed using Student's *t*-test, with or without Welch's correction. Biological indices (GSI and K) and hormonal levels were compared using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test (Zar 2009).

Results

Testis of *P. argenteus* showed anastomosed seminiferous tubules (Fig. 2a), with different types of germ cell (spermatogonia to spermatozoa) distributed along the entire length of the testes (Fig. 2b–d). Undifferentiated type A spermatogonia (SPG_{Aund}) have a large nucleus and a conspicuous nucleolus and are found as single cell (Fig. 2b). Differentiated type A spermatogonia (SPG_{Adiff}) are found in cysts with two to eight cells, have a round nucleus and evident nucleolus and are somewhat smaller than SPG_{Aund} (Fig. 2b, c). Type B spermatogonia (SPG_B) have reduced nuclei with condensed chromatin in sparse regions, evident nucleolus and an increasing number of spermatogonia per cyst (Fig. 2b, c). Primary spermatocytes showed ovoid nucleus with chromatin organized in different phases of the first meiotic division (Fig. 2c). Secondary spermatocytes are rare, because second meiotic phase is quick. They have a round nucleus with reduced volume and dense chromatin (Fig. 2c). Spermatids showed highly reduced nucleus with condensed chromatin in different phases of compaction (Fig. 2c). Spermatozoa showed ovoid head strongly condensed chromatin (Fig. 2d). Testicular activity was categorized in four maturity stages (resting, maturation, mature and spent) according to the germ cells' distribution (Fig. 2b–e).

Physiochemical water parameters and seasonal changes in the testicular activity

In fish from site 2, the GSI values followed the seasonal variations of physiochemical water parameters during the sampling periods (Fig. 3a; Table 1). A peak of GSI was obtained in November, when temperature and frequency of fish in maturation stage

(M2 and M3) increased (Fig. 3b–c). The highest water temperatures (24–25 °C) were recorded in February and May, when fish in spent stage (M4) were found. Compared to site 2, significantly lower values of GSI occurred in November and February in site 1, where values of temperature, oxygen and conductivity were significantly lower and a higher rate of fish in M1 was found (Table 1; Fig. 3a). Values of oxygen above 6 mg/L were measured in all sampling periods from site 2; however, values below 4 mg/L were frequently registered in site 1, except for August. Secchi disc depth of over 2 m occurred in August, when water transparency was elevated, but it was reduced in November and February (reproductive period) during rainy season. Fulton's condition factor showed no significant differences between the sampling periods and between river sites ($K = 1.31 \pm 0.01$, $p > 0.05$).

Sex steroid levels

In fish from site 2, serum concentrations of T followed the variations in GSI, with significantly higher values obtained in November and February (Fig. 4). In site 1, levels of T and E2 showed no significant differences between sampling periods. Comparing the river sites, significantly higher values were detected in site 2 for the concentrations of T and E2 during testicular maturation (August to February) and 17 α -P during post-spawning and resting periods (May and August).

Morphometric analyses of spermatogenesis

Diameter of the seminiferous tubules was significantly greater in fish from site 2 ($298.53 \pm 4.29 \mu\text{m}$) when compared to site 1 ($169.38 \pm 5.84 \mu\text{m}$), with $p < 0.001$. The volumetric proportion of germ cells and somatic cells represented about 82–86 % of the testis, other testicular components about 8–12 % and artefacts about 6 % (Table 2). SPG_{Aund} was about 1 % in both sites, with no significant difference between river sites. Volumetric proportion and number of cysts of SPG_{Adiff} and SPG_B were significantly higher in fish from site 1, where spermatogonial proliferation (PCNA) and apoptosis (TUNEL) were also more elevated (Fig. 5 and Table 2). In fish from site 2, morphometric parameters as well as PCNA and TUNEL reactions were more elevated in spermatozoa. No significant difference was obtained for

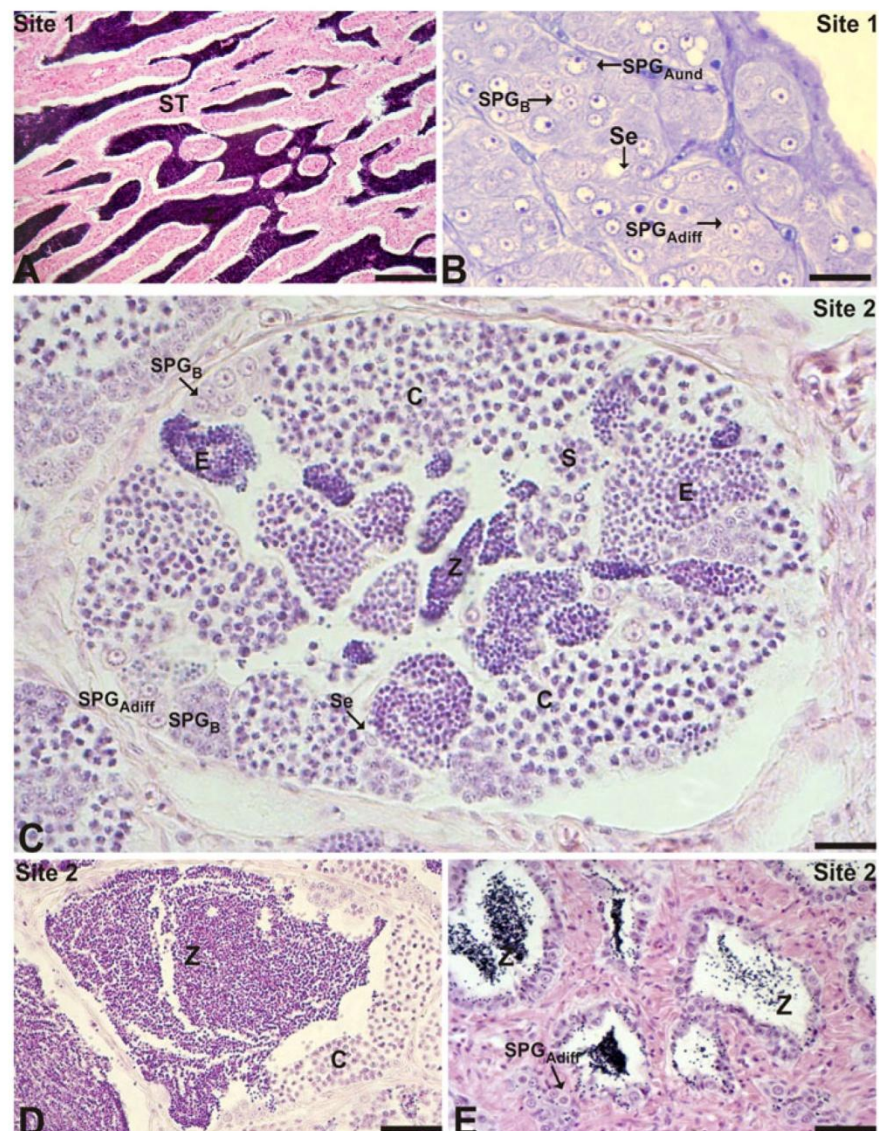


Fig. 2 Histological sections of testes of *P. argenteus* in different maturity stages, stained with haematoxylin-eosin. **a** Anastomosed seminiferous tubules (ST); **b** resting stage with undifferentiated type A spermatogonia (SPG_{Aund}), differentiated type A spermatogonia (SPG_{Adiff}), type B spermatogonia (SPG_B) and Sertoli cells (Se); **c** maturation stage with cysts of

SPG_A, SPG_B, primary (C) and secondary spermatocytes (S), spermatids (E) and spermatozoa (Z); **d** mature stage with large number of spermatozoa (Z) in the tubular lumen and fewer cysts of spermatocytes; **e** spent stage with residual spermatozoa (Z) and differentiated type A spermatogonia (SPG_{Adiff}). Bars = 199 μm (a), 30 μm (b), 16 μm (c), 18 μm (d), 50 μm (e)

TUNEL during spermiogenesis between the sites. In relation to somatic cells, a significantly higher volumetric proportion of Leydig cells were observed in site 2 and of Sertoli cells in site 1. SPG_{Aund}, SPG_{Adiff}, spermatozoa and somatic cells were not labelled for TUNEL assay.

Discussion

In the present study, seasonal changes in testicular activity and concentrations of sex steroids associated with morphometric analyses of spermatogenesis allowed an accurate evaluation of the reproductive

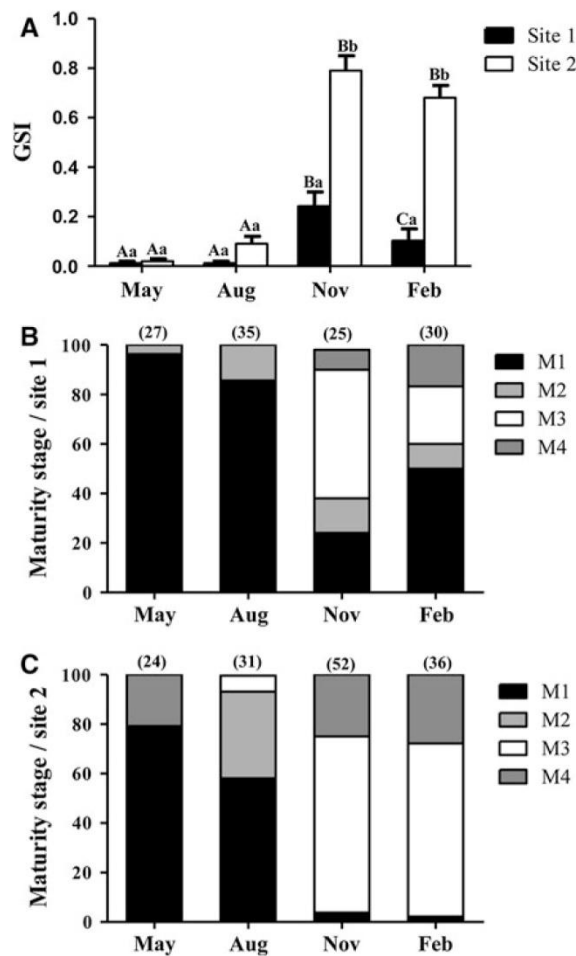


Fig. 3 a Seasonal variations of gonadosomatic index (GSI) and b–c relative frequency (%) of maturity stages in *P. argenteus* from two sites of the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam: b site 1, above the mouth of the Abaeté River and c site 2, below the mouth of the Abaeté River. Resting (M1), maturation (M2), mature (M3) and spent (M4). Values of GSI are expressed as mean ± SEM

histophysiology in males of *P. argenteus* from the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam. Gonadal and endocrine changes demonstrated a better reproductive fitness in males from site 2, where spawned females were also caught (Sato et al. 2005; Arantes et al. 2010). Taken together, these studies indicate that the Abaeté River plays an important role in the reproductive success and conservation of fishing stocks in the São Francisco River, particularly in the area under influence of the Três Marias Dam.

In river site 2, an evident peak of GSI and high incidence of sexually mature males (M3 stage) occurred in November, coinciding with a time of high photoperiod as well as an increase in water temperature, turbidity and conductivity. Values of oxygen dissolved in water above 6 mg/L were adequate for testicular histophysiology, similar to data obtained for carpa *Cyprinus carpio* submitted experimentally to 7 mg/L of oxygen (Wu et al. 2003). Under hypoxia stress with 1 mg/L of oxygen, the same authors observed inhibition of testicular maturation and a disturbance in levels of sex steroids, as also found in *P. argenteus* from site 1. The low values of GSI and low incidence of males in M3 and M4 stages, during the breeding season (November to February) in site 1, reflect the inadequate water conditions of the São Francisco River, immediately downstream from the Três Marias Dam.

In our study, concentrations of T, E2 and 17 α -P agree with the low testicular activity of *P. argenteus* in site 1, above the mouth of the Abaeté River. Some studies have shown that low temperature and oxygen dissolved in water influence gonadotrophin release, which interferes in testicular growth and maturation (Blazquez et al. 1998; Wu et al. 2003; Weltzien et al.

Table 1 Physicochemical parameters of water quality in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam

	May		August		November		February	
	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2
Temperature (°C)	25.0 ± 0.1 ^a	24.6 ± 0.2 ^a	22.2 ± 0.1 ^a	21.9 ± 0.1 ^a	21.6 ± 0.1 ^a	23.1 ± 0.1 ^b	24.3 ± 0.2 ^a	25.0 ± 0.2 ^a
Oxygen (mg/L)	1.6 ± 0.4 ^a	7.3 ± 0.6 ^b	7.1 ± 0.1 ^a	8.5 ± 0.1 ^a	3.7 ± 0.2 ^a	8.2 ± 0.1 ^b	1.6 ± 0.1 ^a	6.1 ± 0.2 ^b
Secchi disc (m)	0.4 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.1 ^a	2.7 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.1 ^a
pH	5.9 ± 0.1 ^a	6.8 ± 0.1 ^b	6.0 ± 0.1 ^a	6.5 ± 0.6 ^a	6.1 ± 0.1 ^a	6.2 ± 0.1 ^a	6.0 ± 0.1 ^a	6.4 ± 0.1 ^a
Conductivity (µS/cm)	44.4 ± 0.5 ^a	51.9 ± 2.2 ^b	52.0 ± 0.1 ^a	53.9 ± 0.6 ^a	51.0 ± 0.3 ^a	55.3 ± 0.5 ^a	44.5 ± 0.7 ^a	48.7 ± 1.3 ^b

Data were obtained from May 2005 to February 2006. Values represent mean ± SD. Different letters indicate significant differences between river sites. Site 1, first 34 km downstream from the dam. Site 2, located 34–54 km downstream from the dam and below the confluence of the São Francisco River with the Abaeté River

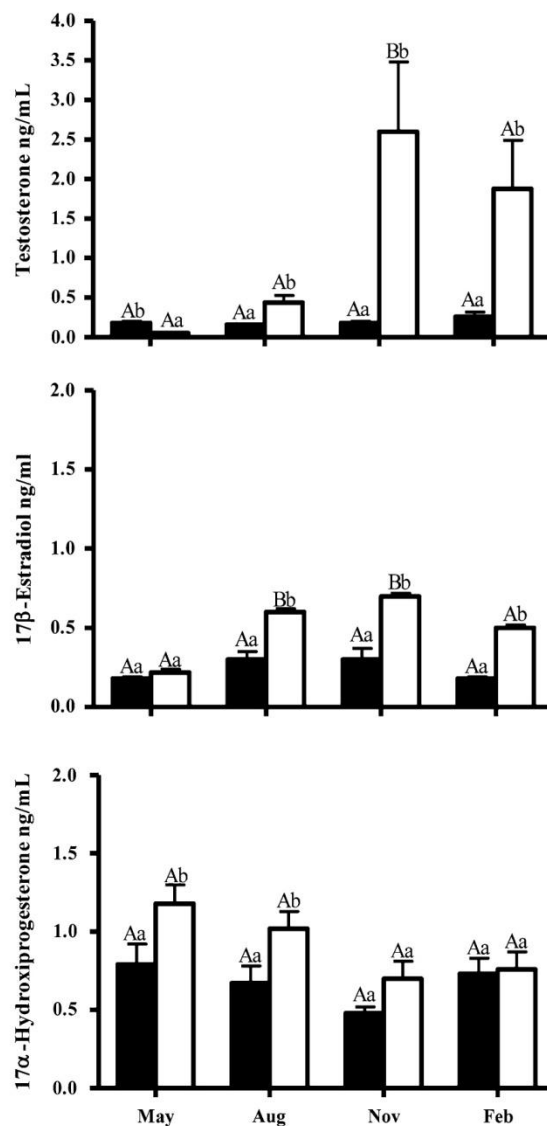


Fig. 4 Seasonal variations of serum concentrations of testosterone, 17β-estradiol and 17α-hydroxiprogesterone in *P. argenteus* from two sites of the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam: (black column) site 1, above the mouth of the Abaeté River and (white column) site 2, below the mouth of the Abaeté River. Values are expressed as mean ± SEM. Different capital letters indicate significant differences between sampling periods, and small letters indicate significant differences between river sites, ($p < 0.05$)

2004). In fish from site 2, T and E2 concentrations followed the variations of the GSI as also reported for *Piaractus mesopotamicus* (Gazola and Borella 1997) and *Rhamdia quelen* in captivity (Barcellos et al. 2002). In fact, E2 acts in spermatogonial proliferation (Miura et al. 1999; Amer et al. 2001; Miura et al.

2003), and T stimulates the testicular maturation (Schulz et al. 2010). Together, these sex steroids could be involved in the progression of spermatogenesis and testicular maturation from August to February in fish from site 2. In late stages of testicular maturity (November to February), 17α-P is converted into DHP, responsible by increase in milt production, induction of spermiation and stimulation of the spermatozoa motility (Baynes and Scott 1985; Miura et al. 1992). However, due to technical limitations, the assay for DHP was not performed in *P. argenteus*. In addition, 17α-P is also precursor of other sex steroids as T and E2, which were more elevated during testicular maturation in fish from site 2. Thus, the lack of significant difference in levels of 17α-P in different sampling periods of the present study could be related to conversion of this hormone in T, E2 or DHP.

Morphometric analyses are essential for the understanding of morphological and functional changes that occur during spermatogenesis (Schulz et al. 2010). In the present study, variations in GSI observed between sites may be related to differences in the process of testicular growth, which are also reflected in morphometric data such as diameter of seminiferous tubules and number of spermatogenic cysts. In fish from site 1, smaller tubular diameter, elevated number of cysts of type A and B spermatogonia and less number of cysts of spermatocytes and spermatids suggest a delay in germ cells' recruitment to spermatogenesis progression. In addition, the larger volumetric proportion of spermatogonia and Sertoli cells in fish from site 1 may be related to the low values temperature (about 21 °C) and oxygen dissolved (about 1.6 mg/L) in the water released from the hypolimnion of the Três Marias Reservoir, during the rainy season. These changes may explain the spermatogonial and Sertoli cell proliferation activity (as evidenced by PCNA) for a possible increase in reproductive activity when these fish find suitable conditions for breeding. Likewise, experimental study in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* showed that low water temperatures (20 °C) induce spermatogonial self-renewal and, when fish were exposed to 35 °C, germ cell differentiation was accelerated, resulting in elevated spermatogenic activity (Alvarenga and França 2009). Higher proliferation of Leydig cells has been related to an increase in androgen production (Schulz et al. 2005), a fact confirmed by the evaluation of T and morphometric analyses in fish from site 2.

Table 2 Morphometric analyses of the spermatogenesis in *P. argenteus* during mature stage in two sites of the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam

	Volume proportion (%)		Germ cells cysts/ seminiferous tubule		PCNA-positive cysts or cells/100 mm ² *		TUNEL-positive cells/ 100 mm ²	
	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2
Type A spermatogonia (und)	1.0 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	0.90 ± 0.2 ^a	nd	nd
Type A spermatogonia (diff)	8.5 ± 1.0 ^a	3.2 ± 0.6 ^b	2.8 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^b	4.0 ± 0.4 ^a	1.02 ± 0.2 ^b	0.5 ± 0.1 ^a	nd
Type B spermatogonia	14.5 ± 1.4 ^a	7.8 ± 0.8 ^b	7.1 ± 0.4 ^a	3.7 ± 0.3 ^b	5.7 ± 0.5 ^a	2.5 ± 0.2 ^b	38.2 ± 6.0 ^a	10.2 ± 4.0 ^b
Primary spermatocytes	5.0 ± 2.4 ^a	14.2 ± 1.4 ^b	1.9 ± 0.5 ^a	7.7 ± 0.5 ^b	0.2 ± 0.1 ^a	5.2 ± 0.4 ^b	5.7 ± 1.0 ^a	20.0 ± 7.1 ^b
Secondary spermatocytes	0.7 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.2 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.1 ^a	nd	nd	0.6 ± 0.2 ^a	1.2 ± 0.9 ^a
Spermatids	2.0 ± 0.8 ^a	7.0 ± 1.0 ^b	1.1 ± 0.1 ^a	3.1 ± 0.2 ^b	nd	nd	7.8 ± 2.4 ^a	13.0 ± 3.9 ^a
Spermatozoa	45.3 ± 3.7 ^a	42.0 ± 3.7 ^a	na	na	nd	nd	nd	nd
Sertoli cells	8.2 ± 1.0 ^a	3.9 ± 0.7 ^b	na	na	44.2 ± 8.4 ^a	13.4 ± 3.9 ^b	nd	nd
Leydig cells	0.5 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.4 ^b	na	na	0.3 ± 0.2 ^a	0.9 ± 0.4 ^a	nd	nd
Others	8.1 ± 2.2 ^a	11.9 ± 3.0 ^a	na	na	nd	nd	nd	nd
Artefacts	6.2 ± 1.2 ^a	6.4 ± 1.4 ^a	na	na	na	na	na	na

Data are expressed as mean ± SEM. Different letters indicate significant differences between river sites, $p < 0.05$; na not applied, nd not detected

Site 1, first 34 km downstream from the dam. Site 2, located 34 to 54 km downstream from the dam and below the confluence of the São Francisco River with the Abaeté River. (und) undifferentiated type A spermatogonia as single cells; (diff) differentiated type A spermatogonia as cysts of 2–8 cells

* PCNA-positive cysts of germ cells or number of undifferentiated type A spermatogonia, Sertoli and Leydig cells

The TUNEL assay associated with histological features supports the cell death by apoptosis in testes of *P. argenteus*. In fish from site 1, the larger number of spermatogonia in apoptosis was found during spermatogonial proliferation, and environmental conditions were unfavourable for germ cells' differentiation during the reproductive period. In fish from site 2, apoptosis was predominant in spermatocytes cysts similar to other species (Prisco et al. 2003; Corriero et al. 2007), possibly related to the failure in mechanism of DNA repair during meiotic recombination, leading to cell removal by apoptosis.

In order to ensure fertility, the reproductive strategy of several migratory fishes of the São Francisco River basin with commercial value involves intense sperm production, a typical pattern of neotropical species with total spawning and absence of parental care such as *Pseudoplatystoma coruscans* (Brito and Bazzoli 2003), *Brycon orthotaenia* (Gonçalves et al.

2006) and *P. argenteus* of the present study. Continuous testicular maturation during the breeding season (November to February) suggests that even after spermatozoa release, germ cells undergo differentiation resulting in high sperm production in fish from site 2. The absence of significant difference for spermatozoa between sites suggests that males from site 1 have efficient sperm reserve; however, unfavourable conditions may be responsible for scarceness of mature females (Arantes et al. 2010) and, hence, interfere in sperm release.

In summary, this study provides evidence of remarkable changes in serum levels of sex steroids and spermatogenesis efficiency in fish that live immediately downstream from the dam. Additionally, our data support morphometric analyses associated with sex steroid profiles as suitable parameters for evaluating the testicular histophysiology of wild fishes.

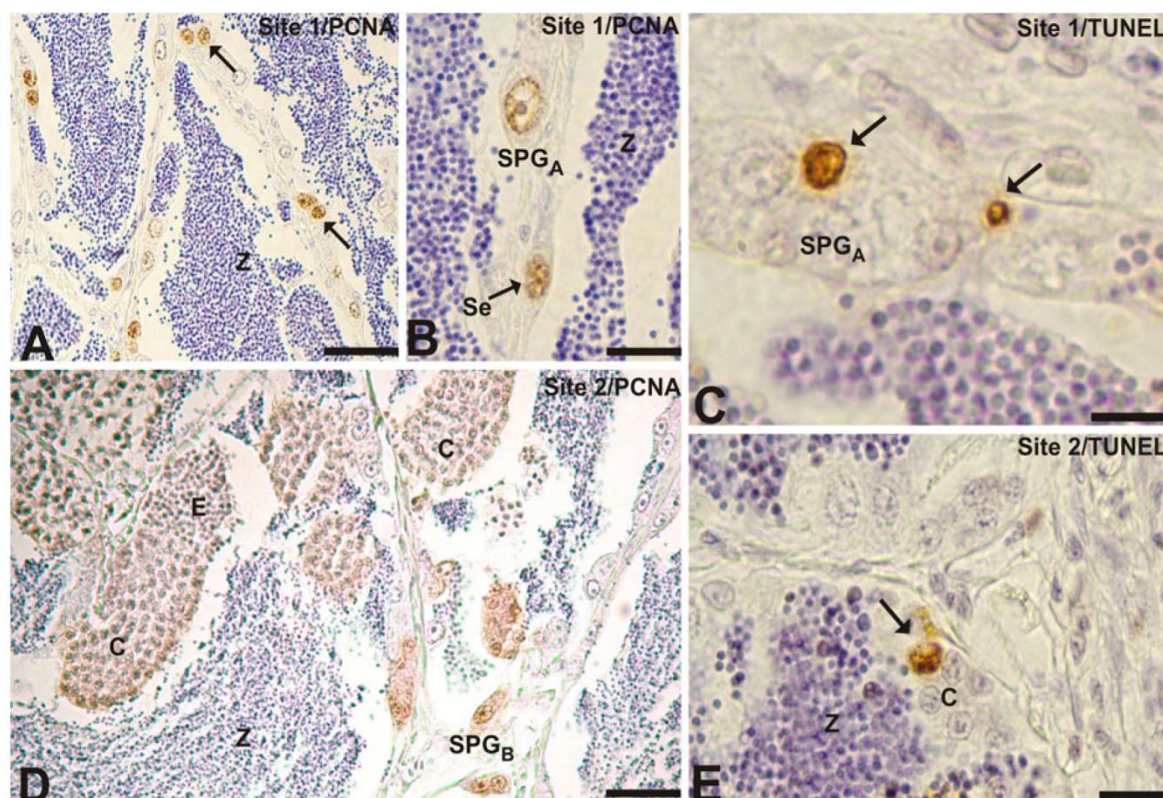


Fig. 5 Immunohistochemistry for PCNA (**a, b, d**) and TUNEL assay (**c, e**) in testes of *P. argenteus* during mature stage. Sections were counterstained with haematoxylin. **a, b, d** PCNA-positive reaction in spermatogonia (*arrow*), Sertoli cell (*Se*) and

primary spermatocytes (*C*). **c, e** TUNEL-positive reaction in primary spermatogonia (SPG_A) and primary spermatocytes (*C*). Spermatozoa (*Z*) were not labelled by TUNEL. Bars: 20 μ m (**a**); 7 μ m (**b**); 9 μ m (**c**); 19 μ m (**d**); 8.3 μ m (**e**)

Acknowledgments The work was supported by grants from Brazilian Research Foundations: FAPEMIG, CNPq and CAPES. We are thankful to the Hydrobiology and Hatchery Station of Três Marias—CODEVASF for furnishing the fish and allowing the execution of this study. We would like to thank Stephen Latham for reviewing the English version of the manuscript and also Dr. Luiz Renato de França and his collaborators for valuable contribution to improve the study.

References

- Almeida FFL, Kristoffersen C, Taranger GL, Schulz RW (2008) Spermatogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel model of cystic germ cell development. *Biol Reprod* 78(1):27–34
- Alvarenga ER, França LR (2009) Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Biol Reprod* 80(3):537–544
- Amer MA, Miura T, Miura C, Yamauchi K (2001) Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol Reprod* 65(4):1057–1066
- Andreu-Vieyra CV, Buret AG, Habibi HR (2005) Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 146(3):1588–1596
- Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N (2010) Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimata-pacu *Prochilodus argenteus* in the Sao Francisco River, downstream from the Tres Marias Dam, Southeastern Brazil. *Anim Reprod Sci* 118(2–4):330–336
- Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N (2011a) Collapse of the reproductive process of two migratory fish (*Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*) in the Tres Marias Reservoir, Sao Francisco River, Brazil. *J Appl Ichthyol* 27(3):847–853
- Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N (2011b) Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimata-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). *Gen Comp Endocr* 172(3):400–408
- Barcellos LJG, Wassermann GF, Scott AP, Woehl VM, Quevedo RM, Ittzes I, Krieger MH, Lullier F (2002) Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle

- of cultured male *Rhamdia quelen*. *J Fish Biol* 61(3): 751–763
- Baum JS, St George JP, McCall K (2005) Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* 16(2):245–259
- Baynes SM, Scott AP (1985) Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocr* 57(1):150–160
- Blazquez M, Bosma PT, Fraser EJ, Van Look KJW, Trudeau VL (1998) Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comp Biochem Phys C* 119(3): 345–364
- Brito MFG, Bazzoli N (2003) Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the Sao Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zoo* 55(5):624–633
- Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J, Ayala AG (2005) An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Biol Reprod* 72(3): 593–601
- Corriero A, Desantis S, Bridges CR, Kime DE, Megalofonou P, Santamaria N, Cirillo F, Ventriglia G, Di Summa A, Defflorio M, Campobasso F, De Metrio G (2007) Germ cell proliferation and apoptosis during different phases of swordfish (*Xiphias gladius* L.) spermatogenetic cycle. *J Fish Biol* 70:83–99
- Gazola R, Borella MI (1997) Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, characidae). *Braz J Med Biol Res* 30(12):1485–1487
- Gonçalves TL, Bazzoli N, Brito MFG (2006) Gametogenesis and reproduction of the matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) (Pisces: Characidae) in the São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. *Braz J Biol* 66(2A):513–522
- Guerrero HY, Cardillo E, Poleo G, Marcano D (2009) Reproductive biology of freshwater fishes from the Venezuelan floodplains. *Fish Physiol Biochem* 35(1):189–196
- Hikim APS, Sverdloff RS (1999) Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4(1):38–47
- Lo Nostro F, Grier H, Andreone L, Guerrero GA (2003) Involvement of the gonadal germinal epithelium during sex reversal and seasonal testicular cycling in the protogynous swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, synbranchidae). *J Morphol* 257(1):107–126
- Marcano D, Cardillo E, Rodriguez C, Poleo G, Gago N, Guerrero HY (2007) Seasonal reproductive biology of two species of freshwater catfish from the Venezuelan floodplains. *Gen Comp Endocr* 153(1–3):371–377
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1992) The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *J Exp Zool* 261(3):359–363
- Miura T, Miura C, Ohta T, Nader MR, Todo T, Yamauchi K (1999) Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Com* 264(1):230–234
- Miura C, Miura T, Yamashita M (2002) PCNA protein expression during spermatogenesis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Zool Sci* 19(1):87–91
- Miura T, Ohta T, Miura C, Yamauchi K (2003) Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* 144(12):5504–5510
- Prisco M, Liguoro A, Comitato L, Cardone A, D'Onguia B, Ricchiari L, Angelini I, Andreuccetti FP (2003) Apoptosis during spermatogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol Reprod Dev* 64(3):341–348
- Santos HB, Sato Y, Moro L, Bazzoli N, Rizzo E (2008a) Relationship among follicular apoptosis, integrin β 1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. *Cell Tissue Res* 332(1):159–170
- Santos HB, Thomé RG, Arantes FP, Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E (2008b) Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology* 70(9):1449–1460
- Sato Y, Godinho HP (2003) Migratory fishes of the São Francisco River. In: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A (eds) *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*, World Fisheries Trust/The World Bank/International Development Research Centre, Victoria, pp 195–222
- Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E, Boschi MB, Miranda MOT (2005) Influence of the Abaete River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the Sao Francisco River, downstream from the Tres Marias Dam, southeastern Brazil. *River Res Appl* 21(8): 939–950
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR, Godinho HP (2005) Sertoli cell proliferation in the adult testis: evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod* 73(5):891–898
- Schulz RW, França LR, Lareyre JJ, Legac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T (2010) Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocr* 165(3):390–411
- Thomé RG, Santos HB, Arantes FP, Domingos FFT, Bazzoli N, Rizzo E (2009) Dual roles for autophagy during follicular atresia in fish ovary. *Autophagy* 5(1):117–119
- Thomé RG, Santos HB, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N (2010) Distribution of laminin beta 2, collagen type IV, fibronectin and MMP-9 in ovaries of the teleost fish. *J Mol Histol* 41(4–5):215–224
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen O, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B (2004) The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp Biochem Phys A* 137(3):447–477
- Wu RSS, Zhou BS, Randall DJ, Woo NYS, Lam PKS (2003) Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction. *Environ Sci Technol* 37(6):1137–1141
- Zar JH (2009) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey

4.2. Artigo 2

(A ser publicado na Microscopy Research and Technique)

Decision Letter (MRT-12-136.R2)

From: gcr@dartmouth.edu
To: ictio@icb.ufmg.br
Subject: Microscopy Research and Technique - Decision
on Manuscript ID MRT-12-136.R2
Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Dr. Rizzo,

It is a pleasure to **accept your manuscript** entitled "Role of HSP70 in the regulation of the testicular apoptosis in a seasonal breeding teleost *Prochilodus argenteus* from the São Francisco River, Brazil" in its current form for publication in Microscopy Research and Technique.

A signed copyright transfer agreement is needed for publication. You can access the copyright transfer agreement at <http://media.wiley.com/assets/1540/87/ctaus.pdf>

Thank you for your fine contribution.

Sincerely,

Prof. George Ruben
Editor-in-Chief, Microscopy Research and
Technique
gcr@dartmouth.edu, gcr@dartmouth.edu

Date Sent: 23-Dec-2012



**Role of HSP70 in the regulation of the testicular apoptosis
in a seasonal breeding teleost *Prochilodus argenteus* from
the São Francisco River, Brazil**

Journal:	<i>Microscopy Research and Technique</i>
Manuscript ID:	MRT-12-136.R2
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Domingos, Fabricio; Universidade Federal de Minas Gerais, Morfologia Thomé, Ralph; Universidade Federal de Minas Gerais, Morfologia Martinelli, Patricia; Universidade Federal de Minas Gerais, Morfologia Sato, Yoshimi; 3Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, CODEVASF, Bazzoli, Nilo; Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados Rizzo, Elizete; Universidade Federal de Minas Gerais, Morfologia
Keywords:	heat shock protein, cell proliferation, caspase-3, spermatogenesis, migratory fish

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Role of HSP70 in the regulation of the testicular apoptosis in a seasonal breeding**
2 **teleost *Prochilodus argenteus* from the São Francisco River, Brazil**

3

4 Fabricio F. T. Domingos ^a, Ralph G. Thomé ^a, Patrícia M. Martinelli ^a, Yoshimi Sato ^b,
5 Nilo Bazzoli ^c, Elizete Rizzo ^{a,*}

6

7 ^a *Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal*
8 *de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil*

9 ^b *Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, Companhia de*
10 *Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba-CODEVASF, Três Marias,*
11 *MG, Brasil*

12 ^c *Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados, Pontifícia Universidade*
13 *Católica de Minas Gerais, PUC Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil*

14

15 **Running title:** HSP70, PCNA and apoptosis in fish testis

16

17 * Corresponding author: Fax +55 3134092771

18 E-mail address: ictio@icb.ufmg.br (E. Rizzo)

19 Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
20 Minas Gerais, UFMG, C. P.486, 30161-970 Belo Horizonte, MG, Brasil

21

22

23

24 **Key Words:** heat shock protein, cell proliferation, caspase-3, spermatogenesis,
25 migratory fish

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60**26 Abstract**

27 The present study investigated the relationship among HSP70, PCNA (proliferating cell
28 nuclear antigen) and testicular apoptosis during a breeding cycle of *Prochilodus*
29 *argenteus*, a neotropical migratory characiform fish of importance in commercial
30 fishery from the São Francisco River basin. A total of 48 (12 fish/sampling) adult males
31 were caught using casting and drifting nets in four samplings from June 2008 to March
32 2009. Immunohistochemistry, Western blotting, TUNEL, ELISA and caspase-3
33 colorimetric assay were assessed in different phases of spermatogenesis. Labelling for
34 HSP70 occurred in spermatogonia (SPG_A 18.0 ± 1.5 and SPG_B 27.9 ± 1.0 in 100 mm^2 ,
35 respectively) and Sertoli cells in all sampling periods, with higher values in June
36 (resting period) while spermatocytes were labelled in September (maturation period)
37 and December (ripe period). For PCNA, immunoreaction was predominant in
38 spermatogonia in June and September, while primary spermatocytes were labelled
39 mainly in December (18.7 ± 2.0). TUNEL-positive reaction occurred throughout the
40 sampling periods, and labelling was detected in the nucleus of germ cells in all
41 developmental phases, except spermatozoa. By ELISA, total HSP70 in testis increased
42 significantly from June to December, and decreased in March (regression period), $p <$
43 0.05 . Caspase-3 activity decreased from June to December and increased in March.
44 Taken together, our results suggest that HSP70 may protect the germ cells from
45 caspase-3-dependent apoptosis during testicular activity and, reduction of HSP70 and
46 increase of apoptosis contribute for testicular remodelling after the breeding season in
47 wild populations of *P. argenteus* in the São Francisco River.

48

49 Introduction

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

50 In fish, a wide range of environmental and physiological factors induces cells to
51 rapidly synthesize highly conserved heat shock proteins (HSPs) with molecular weight
52 varying from 16 to 100 kDa, which regulate cellular metabolism, growth, differentiation
53 and apoptosis (Morimoto et al., 1998; Feder and Holfmann, 1999; Deane and Woo,
54 2011). The 70kDa multigene family encodes several closely related HSPs (HSP70)
55 which are expressed constitutively or induced in response to a wide range of
56 endogenous and exogenous factors (Feder and Holfmann, 1999; Deane and Woo, 2011).
57 In general, HSP70 assists the folding of nascent polypeptide chains, acting as a
58 molecular chaperone, and also mediates repair and degradation of misfolded proteins
59 (Kiang and Tsokos, 1998; Fulda et al., 2010). In mammals, HSPs are important for
60 testicular development and activity of HSP70 as chaperone is necessary in different
61 phases of spermatogenesis (Eddy, 1999; Kamaruddin et al., 2004; Volpe et al., 2008). In
62 teleosts, expression of HSP70 has been evaluated under stress conditions in different
63 tissues but, no study evaluated the relationship among HSP70, cell proliferation and
64 apoptosis in fish testis during the reproductive cycle.

65 In testis, apoptosis plays a crucial role in normal development of male germ cells and
66 it occurs spontaneously during spermatogenesis (Baum et al., 2005; Tripathi et al.,
67 2009). One of the key components in the apoptotic machinery is a cascade of cysteine
68 proteases known as caspases (Takle and Andersen, 2007). These enzymes are divided as
69 initiator caspase-2, -8, -9, -10 and effector caspase-3, -6, -7, in which the caspase-3 has
70 been reported during germ cells development in fish testis submitted experimentally to
71 different environmental stressors (Ito et al., 2003; Fischer et al., 2005; Migliarini et al.,
72 2005; McClusky et al., 2008).

73 The cascade of molecular events regulating the gametogenesis and gonadal maturation
74 furnish essential parameters for knowledge of reproductive strategies, i.e. germ cell

1
2
3 75 development, spawning, egg adhesiveness, which are essential for conservation of the
4
5 76 ichthyofauna. The species of present study, curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* Spix
6
7 77 & Agassiz, 1829, is an endemic characiform fish that supplies fisheries in several
8
9 78 regions of the São Francisco River basin, has an illiophagous feeding habit and reaches
10
11 79 over 10 kg body weight, and first sexual maturity happen with 27-28 cm of total length
12
13 80 (Sato and Godinho, 2003; Sato et al., 2005). The species performs migration upstream
14
15 81 to spawn, has high fecundity, total spawning and reproductive period extending from
16
17 82 November to January in the rainy season, coinciding with the time of flooding, higher
18
19 83 temperatures, and long photoperiods (Sato and Godinho, 2003; Arantes et al., 2010).
20
21 84 The populations of *P. argenteus* have been reduced in the later decades due to river
22
23 85 damming and growing environmental degradation. Recent studies conducted in the São
24
25 86 Francisco River downstream from the Três Marias dam revealed that this species
26
27 87 encountered favourable conditions for spawning and reproduction after the mouth of the
28
29 88 Abaeté River, so this tributary has been considered an important site for conservation of
30
31 89 migratory species in the São Francisco River (Arantes et al., 2010; Domingos et al.,
32
33 90 2012).
34
35
36
37

38
39 91 Despite the interest that has been given to HSPs, few studies have addressed questions
40
41 92 about the effects of naturally occurring variations in environmental and physiological
42
43 93 parameters on the levels of HSP70 in fish tissues. In this context, the present study was
44
45 94 intended to investigate the involvement of HSP70 in cell proliferation and testicular
46
47 95 apoptosis during spermatogenesis and, in addition, evaluate levels of total HSP70 and
48
49 96 caspase-3 activity in different phases of testicular maturation of *P. argenteus* in the São
50
51 97 Francisco River.
52
53

54 98

55
56 99 **Materials and methods**
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

100 **Study area and fish sampling**

101 This study was performed in the São Francisco River, area sited after the mouth of the
102 Abaeté River (18°11'S, 45°14'W) about 34 to 54 Km downstream from the Três Marias
103 dam. Fish were caught by fishermen using casting and drifting nets. A total of 48 adult
104 males of *P. argenteus* ($n = 12/\text{sampling}$) were chosen following the seasonal variations
105 of the reproductive cycle in four samplings from June 2008 to March 2009: resting
106 (June/08), maturation (September/08), ripe (December/08) and regression (March/2009)
107 (Boncompagni-Júnior et al., 2012). During the fish sampling water parameters
108 (temperature, concentration of dissolved oxygen, pH, and conductivity) were recorded
109 in the morning, using a Horiba model W-22XD instrument. Specimens were transported
110 in oxygenized tanks to the Hydrobiology and Hatchery Station of Três Marias, Minas
111 Gerais, southeastern Brazil for the study. Then, fish were killed by transversal section of
112 the spinal cord following the ethical principles established by the Brazilian College of
113 Animal Experimentation (COBEA). For each specimen, total length ($L_T = 40$ to 48 cm)
114 was measured and, body weight ($W_B = 0.7$ to 1 Kg) and testicular weight ($W_T = 0.1$ to
115 13 g) were obtained in order to calculate the gonadosomatic index ($I_G = 100 W_T W_B^{-1}$).
116 The research was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation
117 (CETEA) from the Federal University of Minas Gerais, Brazil.

118

119 **Histology and immunohistochemistry**

120 Samples of the middle region of the testes were fixed in Bouin's fluid, embedded in
121 paraffin, sectioned with 5 μm thickness and stained with haematoxylin and eosin for
122 histology. For detection of HSP70 (mouse anti-HSP70 monoclonal antibody, clone
123 BRM-22 Sigma–Aldrich, 1:80) and PCNA (mouse anti-PCNA, clone PC10 Santa Cruz
124 Biotechnology, 1:100), testis sections were incubated with 3% hydrogen peroxide in

1
2
3 125 phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature for blockage of
4
5 126 endogenous peroxidase. For the antigen retrieval, sections were boiled in 0.01 M citric
6
7 127 acid (pH 6.0) for 20 min. Next, samples were treated for 1 h in 2% bovine serum
8
9 128 albumin (BSA, Sigma–Aldrich Inc.) and 2% goat serum for non-specific staining
10
11 129 blockage. The primary antibody was applied to the sections overnight at 4°C.
12
13 130 Following, the sections were incubated for 45 min with biotinylated goat anti-rabbit
14
15 131 secondary antibody (Kit LSAB®2 DakoCytomation, Carpinteria, CA USA), treated
16
17 132 with peroxidase-conjugated streptavidin for 45 min, revealed with diaminobenzidine
18
19 133 (DAB, Sigma–Aldrich Inc.) and counterstained with haematoxylin. The negative
20
21 134 control was performed excluding the primary antibody.
22
23
24
25
26

27 **Western blotting**

28
29 137 The specificity of the antibodies HSP70 and PCNA was determined by Western
30
31 138 blotting. The total protein was obtained by Bradford (1976). Briefly, frozen samples
32
33 139 were sonicated in cell lysis buffer with protease inhibitors, the homogenate was
34
35 140 centrifuged at 120,000 g for 30 min and the supernatant, containing the proteins, was
36
37 141 submitted to 12% electrophoresis gel. After transferring to a nitrocellulose membrane,
38
39 142 non-specific reactions were blocked with 1% BSA. The membrane was incubated in
40
41 143 Snap-id system for 20 min with one of the primary antibodies (PCNA, 1:300; HSP70,
42
43 144 1:500). After three washes with PBS containing Tween 20, the membrane was
44
45 145 incubated for 10 min with peroxidase-conjugated secondary antibody (IgG Sigma,
46
47 146 1:500) and revealed with DAB in PBS containing chloronaphthol, methanol and
48
49 147 hydrogen peroxide.
50
51
52
53
54
55

56 ***In situ* TUNEL assay**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

150 For apoptosis analysis, testis sections were submitted to *in situ* TUNEL (Terminal
151 transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling) assay, using the TdT-FragEL DNA
152 fragmentation detection kit QIA 33 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) following the
153 manufacturer's protocol. Briefly, the sections were washed in TRIS buffer saline pH 7.6
154 (TBS), treated with 10 µg/mL proteinase K in 0.01 M Tris-HCl buffer at pH 8 for 15
155 min, and then treated with 3% hydrogen peroxide in TBS for 30 min to inactivate
156 endogenous peroxidase. Next, the sections were incubated with terminal
157 deoxynucleotidyl transferase (TdT) and biotinylated deoxynucleotides for 2 h at 37°C.
158 The peroxidase-conjugated streptavidin was applied for 45 min at room temperature and
159 the reaction developed with DAB in TBS for 8 min. The sections were counterstained
160 with haematoxylin. The negative control excluded treatment with TdT/labelled
161 deoxynucleotides.

162 163 **Morphometry**

164 For all morphometric analyses 10 fish from each sampling period were used.
165 Chromatin organisation and nuclear diameter were used to identify germ cells. The
166 nuclear diameter of germ cell was obtained by measuring 150 cells in each
167 developmental stage using a micrometric ocular attached to a light microscope at 1000x
168 magnification. Cysts of germ cells, Sertoli cells and apoptotic cells labelled for HSP70,
169 PCNA and TUNEL were quantified per area of (100 mm²) in 15 fields (150
170 fields/period) which were chosen randomly for each fish and examined at 400x
171 magnification as described by Domingos et al. (2012). Primary and secondary
172 spermatocytes were grouped as spermatocytes in the morphometric analysis.

173 174 **ELISA**

1
2
3 175 Testicular HSP70 levels were evaluated using Total HSP70 DuoSet IC ELISA kit
4
5 176 (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany). Frozen samples of the middle
6
7 177 region of the testis ($n = 10$ /sampling) were sonicated in a cold extraction 20 mM Tris–
8
9 178 HCl buffer at pH 8.0 with 137 mM NaCl, 1% NP40 detergent, 10% glycerol, 2
10
11 179 mMphenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ M pepstatin A, 10mM EDTA, 10 μ M E-64 and
12
13 180 0.5 mM sodium vanadate (Sigma products, St. Louis, MO). The sample solution was
14
15 181 centrifuged at 14,000 g for 20 min at 4 °C. The supernatants were frozen at -70°C until
16
17 182 assayed. Briefly, 96 well plates were incubated with capture antibody overnight at room
18
19 183 temperature, and after three washes with the samples for 2 h at room temperature. For
20
21 184 all plates a standard curve of recombinant HSP70 was performed and some wells
22
23 185 without samples were assayed to technical control. After washing, the plates were
24
25 186 incubated with detection antibody HSP70 for 2 h at room temperature, washed and
26
27 187 incubated again for 20 min with peroxidase-conjugated streptavidin. The reaction was
28
29 188 developed with tetramethylbenzidine substrate and stopped with acid solution.
30
31 189 Absorbance was read at 450 nm (Versamax microplate reader, Molecular Devices,
32
33 190 Sunnyvale, CA). The ELISA assay was validated for species, with spike recovery of
34
35 191 98.2% and the coefficients of variation ranging between 2.7 to 6.4 intra-assay and 5.9 to
36
37 192 8.6 inter-assay. The HSP70 was **normalized** to the total protein content of the sample,
38
39 193 (Bradford, 1976) with Coomassie brilliant blue G-250, using bovine serum albumin as a
40
41 194 standard. Values were expressed as ng of HSP70mg⁻¹ of total protein.
42
43
44
45
46
47
48

195

196 **Caspase-3 colorimetric assay**

197 The enzymatic activity of caspase-3 was assessed using the colorimetric assay from
198 R&D Systems (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany). Samples of the
199 middle region of the testis ($n = 10$ /sampling) were weighed and sonicated in cell lysis

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

200 buffer with protease inhibitors. Homogenates were centrifuged at 20,000 g for 30 min
201 and the supernatant was incubated with substrate for caspase-3 (DEVD-pNA) at 37 °C
202 for 2 h. The absorbance of each sample was recorded at 405 nm and the caspase-3
203 activity level was directly proportional to the colour reaction.

204

205 **Statistical analysis**

206 GraphPad InStat and Prism software were used for statistical analysis. After
207 performing the Kolmogorov Smirnov normality test, the data were processed by
208 ANOVA and Tukey-Kramer multiple comparisons tests. Data presented in figures and
209 tables are expressed as mean ± standard error (SE) with a significance level of $p < 0.05$.

210

211 **Results**

212 **Water physicochemical parameters and testicular activity**

213 Temperature varied from 22 to 25°C, with higher values in December and March
214 (Table 1). Oxygen (above 7 mgL⁻¹), pH (~6) and conductivity (~50 µScm⁻¹) did not
215 show significant variations in the sampling periods. Total length and both weight
216 showed no significant differences among the samplings periods while the testicular
217 weight increased following the gonadal maturation with significant differences among
218 the periods (Table 2).

219 **Histological analysis showed that** in June (resting period), testes of *P. argenteus*
220 showed seminiferous tubules with occluded lumen containing isolated type A
221 spermatogonia (SPG_A, nuclear diameter = 7.60 ± 1.08 µm) and type B spermatogonia
222 (SPG_B, 5.46 ± 0.70 µm) enclosed by cytoplasmic processes of Sertoli cells (Fig. 1A). In
223 September (maturation period), cysts of primary spermatocytes (SPTC₁, 4.87 ± 0.58
224 µm) were numerous while secondary spermatocytes (SPTC₂, 3.24 ± 0.54 µm),

1
2
3 225 spermatids (SPTD, $2.28 \pm 0.41 \mu\text{m}$) and spermatozoa (SPTZ, $1.62 \pm 0.21 \mu\text{m}$) as well as
4
5 226 SPG_A and SPG_B were also observed (Fig. 1B). In December (ripe period), the tubular
6
7 227 lumen was filled with SPTZ, and cysts of SPG_A , SPG_B , SPTC and SPTD were also
8
9 228 frequently observed (Fig. 1C). In March (regression period), testes exhibited mainly
10
11 229 SPG_A and SPG_B associated to Sertoli cells and open tubular lumen containing residual
12
13
14 230 SPTZ (Fig. 1D).

15
16 231

17 18 232 **Detection of HSP70, PCNA and apoptosis during spermatogenesis**

19
20 233 Immunohistochemistry reaction for HSP70 was observed mainly in the cytoplasm of
21
22 234 SPG_A , SPG_B , SPTC and Sertoli cells (Fig 1E-H). A weak reaction was eventually
23
24 235 detected in SPTD and SPTZ (data not shown). Nuclear labelling was observed in SPG_A
25
26 236 and SPG_B (Fig. 1G). Western blotting analysis revealed a dense ~ 70 kDa band for the
27
28 237 HSP70 antibody in fish testis captured in December (Fig. 1T). Regarding PCNA, the
29
30 238 immunoreaction was localised in the nucleus of SPG_A , SPG_B , SPTC₁ and Sertoli cells
31
32 239 (Fig. 1I-L) and no labelling was observed in SPTC₂, SPTD and SPTZ. In Western
33
34 240 blotting, an evident ~ 36 kDa band for the PCNA antibody was evident in testis of fish
35
36 241 sampled mainly in June (Fig. 1U). The TUNEL-positive reaction was detected in the
37
38 242 nucleus of germ cells in all developmental phases (Fig. 1M-P), except SPTZ. In some
39
40 243 cysts, nucleus of Sertoli cells was also labelled by TUNEL reaction (Fig. 1M). Isolated
41
42 244 cells were observed in tubular lumen mainly in December (Fig. 1O). Negative controls
43
44 245 for HSP70, PCNA and TUNEL reactions are shown in Fig. 1Q-S.

45
46 246 Morphometric analyses showed SPG_A and SPG_B labelled for HSP70, PCNA and
47
48 247 TUNEL in all sampling periods (Fig. 2). Regarding HSP70, significantly higher
49
50 248 labelling in cysts of SPG_A and SPG_B (18.0 ± 1.5 and 27.9 ± 1.0 in 100 mm^2 ,
51
52 249 respectively) occurred in June, and then decreased progressively in September and
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

250 December (Fig. 2A). Sertoli cells were significantly more **positive** for HSP70 in
251 September while cysts of SPTC were mainly labelled in December. For PCNA, SPG_A
252 and SPG_B-positive cysts were significantly higher in June and September and SPTC₁
253 (18.7 ± 2.0) in December (Fig. 2B). Sertoli cells showed low variations for PCNA in
254 sampling periods, with significantly higher values in June (5.15 ± 0.2). PCNA-positive
255 Leydig cells were rarely observed in June (0.8 ± 0.1), September (0.6 ± 0.1) and March
256 (0.4 ± 0.1), and did not occur in December (data not shown). Considering the TUNEL
257 reaction, SPG_A and SPG_B-positive cells were higher in September, SPTC in December,
258 Sertoli cells in March while TUNEL-positive **SPTD** occurred only in December (Fig.
259 2C).

260 By ELISA, levels of HSP70 in testis of *P. argenteus* increased significantly from June
261 to December, and decreased in March following the I_G variations (Fig. 3A-B). Caspase-
262 3 activity in testis decreased from June to December and increased in March (Fig. 3C),
263 as opposed to I_G and HSP70.

264 265 **Discussion**

266 The heat shock HSP70 has an essential role in cellular homeostasis and its
267 relationship with cell proliferation and apoptosis is critical in gametogenesis and fish
268 reproduction. The present study showed levels of total HSP70 assessed by ELISA
269 following the seasonal variations of testicular activity as detected by gonadosomatic
270 index indicating a role of HSP70 in cytoprotection of germ cells during spermatogenesis
271 of *P. argenteus*, a native characiform species used as model in environmental studies in
272 the São Francisco River (Arantes et al., 2010; Domingos et al., 2012; Thomé et al.,
273 2012). Reports on levels of HSP70 in favourable environmental conditions are scarce

1
2
3 274 and were not reported for fish from the São Francisco River. In addition, these data can
4
5 275 be useful when comparing normal physiological condition to stress conditions.
6

7 276 Interestingly, the increase of HSP70 levels in testis of *P. argenteus* was associated
8
9 277 with the decrease of caspase-3 activity from June to December; thus it was noteworthy
10
11 278 to infer that HSP70 may protect the germ cells from caspase-3-dependent apoptosis.
12
13 279 Indeed, HSP70 prevents apoptosis by binding to Apaf-1, promoting its inhibition;
14
15 280 hence, caspase-9 activation and subsequently caspase-3 activity become unfeasible
16
17 281 (Zhang et al., 2003). Moreover, HSP70 also can bind to AIF (apoptosis inducing factor),
18
19 282 blocking its action and, thus, the caspase-independent apoptosis pathway (Parcellier et
20
21 283 al., 2003). Additionally, decrease of HSP70 and increase of apoptosis in March could
22
23 284 contribute to testicular remodelling after the breeding season.
24
25

26
27 285 In the current study, HSP70 was immunolocalised mainly in the cytoplasm of SPG_A,
28
29 286 SPG_B, SPTC and Sertoli cells. The nuclear staining for HSP70, which was observed in
30
31 287 SPG_A and SPG_B, could suggest its contribution to assist the protein translocation to the
32
33 288 nucleus, a molecular chaperone role (Angelier et al., 1996). In mammals, HSP70
34
35 289 immunostaining has been shown in all developmental stages of germ cells, from
36
37 290 spermatogonia to spermatozoa (Kamaruddin et al., 2004; Wu et al., 2011). In this study,
38
39 291 labelling in SPTD and SPTZ was eventually observed and, immunofluorescence studies
40
41 292 with semen of mammals confirm the presence of HSP70 in spermatozoa (Kamaruddin
42
43 293 et al., 2004; Volpe et al., 2008).
44
45

46
47 294 As in other tissues, the number of germ and somatic cells in fish testis is determined
48
49 295 by a balance between cell proliferation and apoptosis (Tripathi et al., 2009). In the
50
51 296 present study, immunostaining for PCNA occurred in SPG_A, SPG_B and SPTC₁
52
53 297 supporting the proliferative and meiotic phases of spermatogenesis in order to ensure an
54
55 298 efficient spermatic reserve in *P. argenteus*. Indeed, PCNA is commonly detected during
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

299 spermatogonial phase in diverse fish species (Miura et al., 2002, Corriero et al., 2007;
300 Loppion et al., 2008), but also supports DNA repair in the meiotic phase (Franco et al.,
301 2010). Similar to other fish species, SPG_A, SPG_B, SPTC and SPTD of *P. argenteus*
302 were labelled by TUNEL assay and the spontaneous degeneration of germ cells agrees
303 with the normal testicular development (Cinquetti and Dramis, 2003). However, in
304 present study, TUNEL-positive cells were more frequent in September (spermatogonial
305 phase) and in December (meiotic phase and spermiogenesis). Overall, the degeneration
306 of germ cells is common at spermatogonial phase, although in some teleost fish the
307 apoptosis is highest during spermiogenesis (Prisco et al., 2003; Schulz et al., 2005;
308 Corriero et al., 2007). Unusually, TUNEL-positive cells were detected in December
309 (ripe period) in the lumen of seminiferous tubules, maybe apoptotic bodies, however
310 these structures need to be investigated. In general, non-professional phagocytes, i.e.
311 Sertoli cells, are frequently responsible for removal of apoptotic bodies during
312 spermatogenesis (Chaves-Pozo et al., 2005; McClusky et al., 2005). Moreover, higher
313 TUNEL-positive Sertoli cells occurred in March (regression period) during testicular
314 remodelling for the next breeding cycle.

315 Labelling for HSP70 and PCNA in SPG_A, SPG_B and Sertoli cells occurred throughout
316 the studied periods, indicating a potential role of these cells in supporting the successive
317 waves of differentiation into SPTC₁ during the breeding season. In September, HSP70
318 levels in Sertoli cells coincided with higher values of PCNA in SPG_B and SPTC₁. In
319 agreement with data from other studies (Helmbrecht et al., 2000; Kamaruddin et al.,
320 2004; Wu et al., 2011), these findings suggest that HSP70 play an important role in the
321 regulatory network of the cell cycle, acting in the initial phases of spermatogenesis
322 (differentiation of spermatogonia to spermatocytes), promoting protein stabilisation or
323 assisting the removal of misfolded proteins. In December, a significantly greater

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

324 number of SPTC₁ cysts were labelled for PCNA suggesting that HSP70 could act in
325 cytoprotection of germ cells during the meiotic phase, to ensure a higher sperm
326 production in *P. argenteus* when temperature **increases** (Domingos et al., 2012).
327 Conversely, failure in DNA repair during meiotic phase leads to cell removal by
328 apoptosis (Eddy, 1999) such as detected by TUNEL reaction.

329 In summary, the data reported here display an association between the levels of
330 HSP70 and testicular maturation in *P. argenteus*, suggesting that HSP70 may regulate
331 caspase-3-dependent apoptosis in fish testis and, reduction of HSP70 and increase of
332 apoptosis contribute for testicular remodelling after breeding season.

333

334 **Acknowledgments**

335 The work was supported by grants from Brazilian Research Foundations: FAPEMIG,
336 CNPq and CAPES. We are thankful to the Hydrobiology and Hatchery Station of Três
337 Marias - CODEVASF for support the fish collections. We would like to thank Stephen
338 Latham for suggestions on the English version.

339

340 **References**

- 341 Angelier N, Moreau N, Rodriguez-Martin ML, Penrad-Mobayed M, Prudhomme C.
342 1996. Does the chaperone heat shock protein Hsp70 play a role in the control of
343 developmental processes? *Int J Dev Biol* 40:521–529.
- 344 Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N. 2010. Profiles of sex steroids,
345 fecundity, and spawning of the curimata-pacu *Prochilodus argenteus* in the São
346 Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Anim*
347 *Reprod Sci* 118:330–336.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 348 Baum JS, St George JP, McCall K. 2005. Programmed cell death in the germline. *Semin*
349 *Cell Dev Biol* 16:245–259.
- 350 **Boncompagni-Júnior O, Normando FT, Brito MFG, Bazzoli N. 2012. Reproductive**
351 **biology of *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Pisces: Prochilodontidae) in São**
352 **Francisco River, Brazil. *J Appl Ichthyol* 28:1–7.**
- 353 Bradford M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
354 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal*
355 *Biochem* 72:248–254.
- 356 Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J, Ayala AG. 2005. An overview of cell renewal
357 in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the
358 gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biol Reprod* 72:593–601.
- 359 Cinquetti R, Dramis L. 2003. Histological, histochemical and ultrastructural
360 investigations of the testis of *Padogobius martensi* between annual breeding seasons.
361 *J Fish Biol* 63:1402–1428.
- 362 Corriero A, Desantis S, Bridges CR, Kime DE, Megalofonou P, Santamaria N, Cirillo
363 F, Ventriglia G, Di Summa A, Deflorio M, Campobasso F, De Metrio G. 2007. Germ
364 cell proliferation and apoptosis during different phases of swordfish (*Xiphias gladius*
365 L.) spermatogenetic cycle. *J Fish Biol* 70:83–99.
- 366 Deane EE, Woo NYS. 2011. Advances and perspectives on the regulation and
367 expression of piscine heat shock proteins. *Rev Fish Biol Fisher* 21:153–185.
- 368 Domingos FFT, Thomé RG, Arantes FP, Castro ACS, Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E.
369 2012. Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding
370 teleost: a comparative study in area of influence of a tributary, downstream from a
371 hydroelectric power dam, Brazil. *Fish Physiol Biochem* DOI 10.1007/s10695-012-
372 9668-3.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 373 Eddy EM. 1999. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod*
374 4:23–30.
- 375 Feder ME, Hofmann GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the
376 stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243–
377 282.
- 378 Fischer H, Rossiter H, Ghannadan M, Jaeger K, Barresi C, Declercq W, Tschachler E,
379 Eckhart L. 2005. Caspase-14 but not caspase-3 is processed during the development
380 of fetal mouse epidermis. *Differentiation* 73:406–413.
- 381 Franco A, Jouaux A, Mathieu M, Sourdain P, Lelong C, Kellner K, Berthelin CH.
382 2010. Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the
383 Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser
384 microdissected tissues. *Cell Tissue Res* 340:201–210.
- 385 Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. 2010. Cellular stress responses: cell survival
386 and cell death. *Int J Cell Biol* 2010:214074.
- 387 Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. 2000. Chaperones in cell cycle regulation and
388 mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 33:341–365.
- 389 Ito LS, Yamashita M, Takahashi C, Strüssmann CA. 2003. Gonadal degeneration in
390 sub-adult male pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during exposure to warm water.
391 *Fish Physiol Biochem* 28:421–423.
- 392 Kamaruddin M, Kroetsch T, Basrur PK, Hansen PJ, King WA. 2004.
393 Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia*
394 36:327–334.
- 395 Kiang JG, Tsokos GC. 1998. Heat shock proteins 70kDa: Molecular biology,
396 biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 80:183–201.

- 1
2
3 397 Loppion G, Crespel A, Martinez AS, Auvray P, Sourdain P. 2008. Study of the
4
5 398 potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, *Scyliorhinus*
6
7 399 *canicula* L. Cell Tissue Res 332:533–542.
8
9 400 McClusky LM. 2005. Stage and season effects on cell cycle and apoptotic activities of
10
11 401 germ cells and Sertoli cells during spermatogenesis in the spiny dogfish (*Squalus*
12
13 402 *acanthias*). Reproduction 129:89–102.
14
15 403 McClusky LM, Barnhoorn IEJ, van Dyk JC, Bornman MS. 2008. Testicular apoptosis
16
17 404 in feral *Clarias gariepinus* using TUNEL and cleaved caspase-3
18
19 405 immunohistochemistry. Ecotox Environ Safe 71:41–46.
20
21 406 Migliarini B, Campisi AM, Maradonna F, Truzzi C, Annibaldi A, Scarponi G,
22
23 407 Carnevali O. 2005. Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine
24
25 408 teleost *Gobius niger*. Gen Comp Endocrinol 142:241–247.
26
27 409 Miura C, Miura T, Yamashita M. 2002. PCNA protein expression during
28
29 410 spermatogenesis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). Zool Sci 19:87–91.
30
31 411 Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk
32
33 412 between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative
34
35 413 regulators. Genes Dev 12:3788-3796.
36
37 414 Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. 2003. Heat shock proteins,
38
39 415 cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. Biochem Bioph
40
41 416 Res Co 304:505–512.
42
43 417 Prisco M, Liguoro A, Comitato L, Cardone A, D'Onguia B, Ricchiari L, Angelini I,
44
45 418 Andreuccetti FP. 2003. Apoptosis during spermatogenesis in the spotted ray *Torpedo*
46
47 419 *marmorata*. Mol Reprod Dev 64:341–348.
48
49 420 Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E, Boschi MB, Miranda MOT. 2005. Influence of the Abaeté
50
51 421 River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus*
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 422 *argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam,
423 southeastern Brazil. *River Res Appl* 21:939–950.
- 424 Sato Y, Cardoso EL, Godinho AL, Godinho HP. 1996. Hypofisation parameters of the
425 fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station conditions. *Rev Bras*
426 *Biol* 56:59–64.
- 427 Sato Y, Godinho HP. 2003. Migratory fishes of the São Francisco River. In: Migratory
428 fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status. Carolsfeld J,
429 Harvey B, Ross C, Baer A, editors. World Fisheries Trust The World Bank
430 International Development Research Centre, Victoria, pp 195–222.
- 431 Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR, Godinho HP. 2005. Sertoli
432 cell proliferation in the adult testis - Evidence from two fish species belonging to
433 different orders. *Biol Reprod* 73:891–898.
- 434 Takle H, Andersen Ø. 2007. Caspases and apoptosis in fish. *J Fish Biol* 71:326–349.
- 435 Thomé RG, Domingos FFT, Santos HB, Martinelli PM, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N.
436 2012. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and
437 follicular growth in teleost fish. *Tissue Cell* 44:54–62.
- 438 Tripathi R, Mishrab DP, Shaha C. 2009. Male germ cell development: turning on the
439 apoptotic pathways. *J Reprod Immunol* 83:31–35.
- 440 Volpe S, Galeati G, Bernardini C, Tamanini C, Mari G, Zambelli D, Seren E, Spinaci
441 M. 2008. Comparative immunolocalization of heat shock proteins (Hsp)-60, -70, -90
442 in boar, stallion, dog and cat spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 43:385–392.
- 443 Wu YJ, Pei YL, Qin YH. 2011. Developmental expression of heat shock proteins 60,
444 70, 90, and A2 in rabbit testis. *Cell Tissue Res* 344:355–363.
- 445 Zhang JH, Zhang Y, Herman B. 2003. Caspases, apoptosis and aging. *Age Res Rev*
446 2:357–366.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1
Physicochemical parameters of water quality in the São Francisco River

	Temperature (°C)	Oxygen (mgL ⁻¹)	pH	Conductivity (μScm ⁻¹)
Jun /08	22.4 ± 0.1 ^a	7.71 ± 0.1 ^a	5.63 ± 0.1 ^a	49.4 ± 0.1 ^a
Sep/08	22.6 ± 0.1 ^a	7.62 ± 0.1 ^a	6.24 ± 0.2 ^a	50.0 ± 0.1 ^a
Dec/08	24.5 ± 0.2 ^b	7.88 ± 0.1 ^a	6.28 ± 0.1 ^a	53.8 ± 0.1 ^a
Mar/09	25.1 ± 0.1 ^b	7.70 ± 0.1 ^a	5.83 ± 0.1 ^a	50.0 ± 0.1 ^a

Data obtained in June 26-30, 2008; September 17-21, 2008; December 01-04, 2008 and March 01-05, 2009. Values represent mean ± SE. In column, different letters indicate significant differences among samplings periods, p < 0.05.

Table 2
Biometric parameters of *P. argenteus* in the São Francisco River

	Total length (cm)	Body weight (Kg)	Testicular weight (g)
Jun /08	41.2 ± 0.1 ^a	0.73 ± 1.1 ^a	0.15 ± 0.02 ^a
Sep/08	41.6 ± 1.3 ^a	0.82 ± 1.1 ^a	3.0 ± 0.20 ^b
Dec/08	43.8 ± 0.5 ^a	0.87 ± 0.2 ^a	6.24 ± 0.40 ^c
Mar/09	43.2 ± 0.6 ^a	0.93 ± 0.9 ^a	1.80 ± 0.30 ^d

Data obtained in June 26-30, 2008; September 17-21, 2008; December 01-04, 2008 and March 01-05, 2009. Values represent mean ± SE. In column, different letters indicate significant differences among samplings periods, $p < 0.05$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

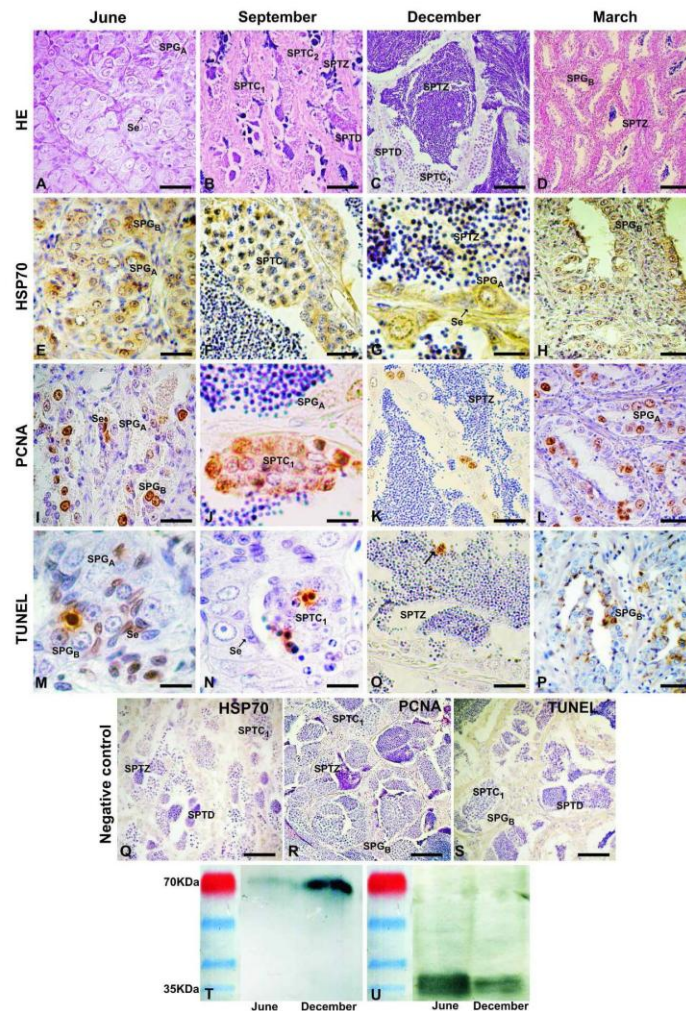


Fig.1. Histological sections of testis of *P. argenteus* from the São Francisco River in different periods of the breeding cycle: resting, June (A, E, I, M), maturation, September (B, F, J, N), ripe, December (C, G, K, O) and regression, March (D, H, L, P). Histological sections stained with haematoxylin and eosin (A-D), immunohistochemistry reactions for HSP70 (E-H) and PCNA (I-L), and TUNEL assay (M-P) counterstained with haematoxylin. Negative controls counterstained with haematoxylin for HSP70 (R), PCNA (S) and TUNEL (T) in September. Seminiferous tubules showing type A and type B spermatogonia (SPGA, SPGB), primary and secondary spermatocytes (SPTC1, SPTC2), spermatids (SPTD), spermatozoa (SPTZ) and Sertoli cells (Se). Western blotting for HSP70 (T) and PCNA (U) in testis of specimens captured in June and December. Bar = 4 μ m (G, J, M-N), 8 μ m (F, R), 10 μ m (A, E, I, S), 15 μ m (H, L, P) and 20 μ m (B-D, J, O, Q). 190x278mm (275 x 275 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

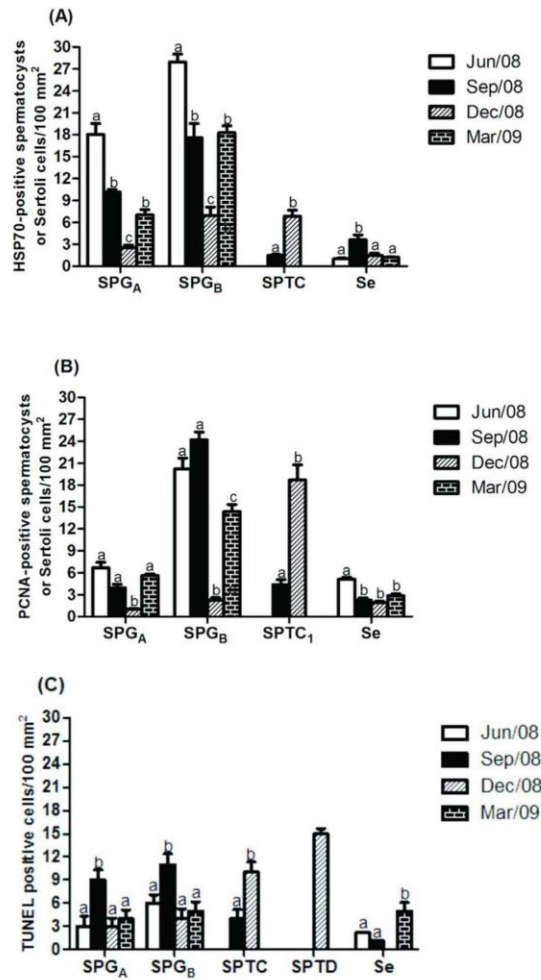


Fig.2. Morphometric analyses of labelled cells for HSP70 (A), PCNA (B) and TUNEL (C) in different periods of the breeding cycle of *P. argenteus* in the São Francisco River. Type A and type B spermatogonia (SPGA, SPGB), primary and secondary spermatocytes (SPTC) spermatids (SPTD) and Sertoli cells (Se). Labelling by PCNA occurred only in primary spermatocytes (SPTC1). Values represent mean ± SE. Different letters indicate significant differences among sampling periods, $p < 0.05$.

130x231mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

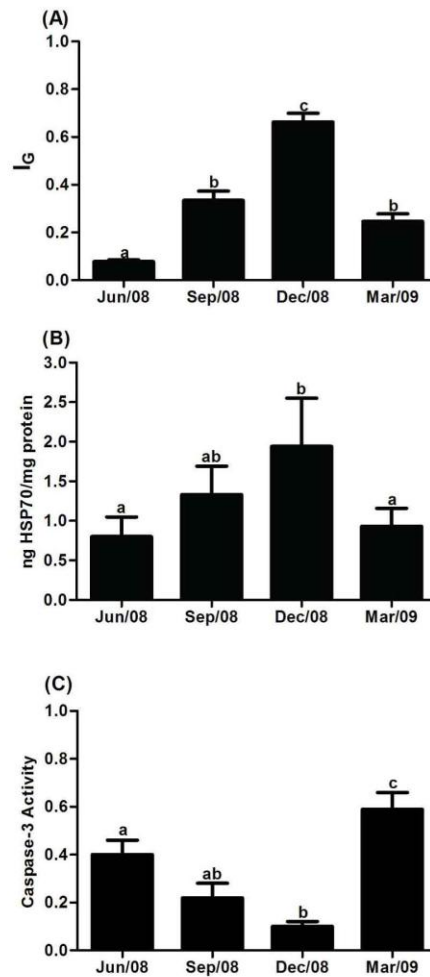


Fig.3. Seasonal changes of testicular activity of *P. argenteus* in the São Francisco River. IG, gonadosomatic index (A), concentration of total HSP70 by ELISA (B) and caspase-3 activity by colorimetric assay (C). Values represent mean \pm SE. Different letters indicate significant differences among sampling periods, $p < 0.05$.

106x211mm (300 x 300 DPI)

4.3. Resultados complementares

4.3. HSP70 e caspase-3 como biomarcador de impacto ambiental

O nível proteico de HSP70 em testículos e fígado foi maior nos peixes coletados imediatamente a jusante da barragem (S1) no período chuvoso (Fig. 8A e 8C). Em ambos os pontos (S1 e S2), os níveis de HSP70 em testículos foram significativamente maiores durante a estação chuvosa em relação à estação seca. Em S2, não houve variação nos níveis HSP70 entre os períodos de coleta para o fígado.

A atividade enzimática da caspase-3 em testículos de *P. argenteus* foi significativamente maior em S1, durante o período chuvoso (Fig. 8B). Em ambos os pontos (S1 e S2), a atividade da caspase-3 em testículos e fígado aumentou significativamente durante a estação chuvosa em relação à estação seca (Fig. 8B e 8D). Não houve diferença significativa entre os pontos do rio para os níveis de HSP70 e caspase-3 em testículos e fígado no período seco e para caspase-3 no período chuvoso.

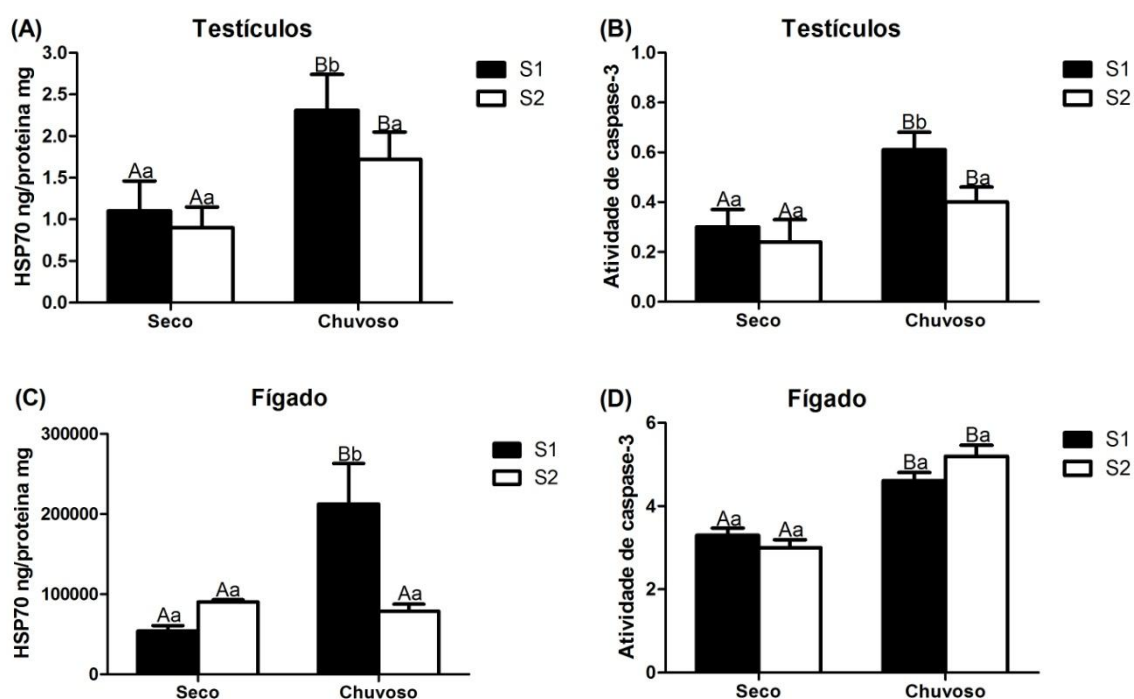


Figura 8 – Níveis proteicos de HSP70 e caspase-3 em testículos (A e B) e fígado (C e D) durante período seco e chuvoso. S1: localizado nos primeiros 34 km do rio, a jusante da barragem de Três Marias e a montante da foz do rio Abaeté (coluna preta). S2: localizado após a confluência com o rio Abaeté (coluna branca). Valores expressos em média \pm EP. Letras maiúsculas indicam diferenças significantes entre os períodos de amostragem e letras minúsculas entre os pontos do rio ($p < 0,05$).

5. Discussão geral

Os barramentos hidrelétricos afetam negativamente os perfis físico-químicos e hidrodinâmicos dos rios, com consequências drásticas para as populações de peixes migradores (Agostinho *et al.*, 2004). No rio São Francisco, a água liberada imediatamente a jusante da barragem de Três Marias não apresentou condições favoráveis à reprodução das principais espécies migradoras (Sato & Godinho, 2003; Sato *et al.*, 2005; Arantes *et al.*, 2010; Domingos *et al.*, 2012). No entanto, a 34 km a jusante da UHE-TRM, o rio Abaeté minimiza o impacto do barramento sobre a reprodução dos peixes, sendo considerado um local de desova para os peixes migradores do Alto do rio São Francisco (Sato & Godinho, 2003). De fato, os tributários livres de barramentos, como o rio Abaeté, atuam como rotas alternativas para várias espécies de peixes, desempenhando um papel importante na manutenção da diversidade biológica regional e estoques populacionais de peixes (Sato *et al.*, 2005; Gubiani *et al.*, 2010).

Diversos estudos têm sido conduzidos no laboratório de Ictiohistologia em busca da compreensão dos mecanismos que regulam a foliculogênese, maturação e regressão ovariana no rio São Francisco (Santos *et al.*, 2008a, b; Thomé *et al.*, 2009, 2010, 2012; Arantes *et al.*, 2010, 2011a, b). No entanto, nenhum estudo avaliou a espermatogênese de peixes do rio São Francisco. A estrutura cística e as mudanças morfológicas que ocorrem durante o ciclo reprodutivo tornam os testículos de peixes um modelo interessante para o estudo da regulação da espermatogênese. Desta forma, o presente trabalho foi realizado em três etapas. Inicialmente avaliamos comparativamente a espermatogênese e os níveis de esteroides sexuais em curimatã-pacu coletados em dois pontos do rio São Francisco com diferentes parâmetros físico-químicos da água. Na segunda etapa, estudamos a relação dos níveis proteicos de HSP70 com as atividades de proliferação celular e apoptose durante o ciclo reprodutivo de *P. argenteus* em condições naturais favoráveis. Finalmente na terceira etapa, investigamos os níveis proteicos de HSP70 e caspase-3 em testículos e fígado como biomarcadores de impacto ambiental no rio São Francisco.

No presente estudo, os níveis plasmáticos de esteroides sexuais estão alterados nos peixes de S1, nos quais os baixos níveis plasmáticos de T e E2 coincidiram com o baixo valor do IGS. Diferentes parâmetros ambientais interferem na reprodução de peixes, sendo a temperatura e o oxigênio dissolvido na água considerados moduladores

da atividade testicular (Alvarenga & França, 2009; Wu *et al.*, 2003). De fato, os baixos valores da temperatura e oxigênio da água do rio São Francisco lançados imediatamente a jusante da barragem de Três Marias, principalmente no período reprodutivo, não favoreceram a esteroidogênese e o crescimento testicular de populações de *P. argenteus* em S1. Nos peixes de S2, as variações do IGS seguiram as concentrações de T e E2, similar aos resultados obtidos com outras espécies de peixes mantidos em cultivo (Gazola & Borella, 1997; Barcellos *et al.*, 2002). O E2 atua na proliferação de espermatogônias (Miura *et al.*, 1999; Amer *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2003) enquanto que o T estimula a maturação testicular (Schulz *et al.*, 2010). Desta forma, T e E2 estão envolvidos na progressão da espermatogênese e maturação testicular de agosto a fevereiro em peixes de S2. Por outro lado, as concentrações de 17α -P não apresentaram variações significativas nos diferentes períodos de amostragens em ambos os pontos do rio São Francisco. A ausência de diferenças expressivas de 17α -P pode estar relacionada à conversão desse hormônio em T, E2 ou DHP durante a espermatogênese de *P. argenteus*.

A avaliação da espermatogênese por meio das análises morfométricas permite a compreensão das modificações morfofisiológicas que acompanham a maturação testicular (Schulz *et al.*, 2010). No presente estudo, as variações do IGS de *P. argenteus* nos dois pontos do rio São Francisco refletem as diferenças encontradas nos parâmetros morfométricos. Durante o pico reprodutivo, peixes de S1 apresentaram menor diâmetro tubular, maior proporção volumétrica e número de cistos de espermatogônias tipo A e B. A baixa taxa de oxigênio e temperatura da água liberada do reservatório de Três Marias podem ser responsáveis pelo atraso do processo espermatogênico, mantendo a proliferação das células de Sertoli e de espermatogônias (evidenciada pelo PCNA) para um possível aumento da atividade reprodutiva, quando estes peixes encontrarem condições adequadas à reprodução. Em estudo experimental com a tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) evidenciou-se que temperaturas mais baixas (20°C) induzem a auto-renovação das espermatogônias e a proliferação das células Sertoli e Leydig. No entanto, quando as tilápias foram expostas a 35°C, as células germinativas diferenciaram-se rapidamente, acelerando o processo espermatogênico (Alvarenga & França, 2009). A proliferação de células de Leydig tem sido relacionada com o aumento da produção de andrógenos em testículos (Schulz *et al.*, 2005), fato confirmado pelos elevados níveis de T, proporção volumétrica e Leydig PCNA-positivas em peixes de S2.

A formação contínua de cistos das células germinativas, principalmente de cistos de espermatócitos e espermátides em peixes S2, indica que mesmo após a liberação dos espermatozóides para fertilização, células germinativas podem diferenciar-se e liberar mais espermatozóides no mesmo período reprodutivo. Essa estratégia reprodutiva de *P. argenteus*, que envolve a produção expressiva de espermatozóides, é comum para espécies migradoras neotropicais (Brito & Bazzoli, 2003; Batlouni *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2006).

O curimatã-pacu reúne características que o tornam um excelente modelo para estudos decorrentes de alterações ambientais, onde proteínas de choque térmico desempenham um papel central na homeostase celular. Com isso, nós avaliamos a relação entre HSP70, proliferação celular e apoptose durante o ciclo reprodutivo de machos de *P. argenteus* coletados após a confluência do rio Abaeté.

A atividade mitótica das células pode ser suficientemente avaliada por métodos diferentes, isto é, a contagem de figuras mitóticas, a aplicação de nucleotídeos marcados com o BrdU ou a detecção específica da fase S, por meio do antígeno Ki-67 ou PCNA. No presente estudo, a imunomarcagem de PCNA ocorreu em SPG_A, SPG_B, SPTC₁, células de Sertoli e Leydig. De fato, o PCNA, assim como outros marcadores de proliferação é comumente detectado durante a proliferação espermatogonial em diversas espécies de peixes (Vilela *et al.*, 2003; Chaves-Pozo *et al.*, 2005; McClusky, 2005; Corriero *et al.*, 2007). No entanto, o PCNA pode também detectar os processos de reparo de DNA, que ocorre principalmente na fase meiótica da espermatogênese (Franco *et al.*, 2010).

No presente estudo, os níveis de HSP70 em células de Sertoli coincidem com valores expressivos de PCNA para SPG_B e SPTC₁ em peixes coletados em setembro. Estudos realizados em mamíferos sugerem que HSP70 tem papel importante na regulação do ciclo celular, atuando principalmente nas fases iniciais da espermatogênese (Helmbrecht *et al.*, 2000; Kamaruddin *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011). Desta forma, a HSP70 participa da estabilização ou da prevenção da má formação de proteínas importante para o ciclo espermatogênico. Em dezembro, os elevados níveis de HSP70 coincide com a marcação PCNA-positiva em cistos de SPTC₁, indicando um papel para HSP70 na termotolerância na fase meiótica. No entanto, se houver uma falha no reparo do DNA, as células germinativas são eliminadas via apoptose (Eddy, 1999).

A apoptose é um processo comum que ocorre espontaneamente durante toda a espermatogênese. No presente estudo, as células germinativas, com exceção dos

espermatozoides, foram marcadas pela técnica de TUNEL. Marcações TUNEL-positivas foram também encontradas no lúmen dos túbulos seminíferos de *P. argenteus*, provavelmente em corpos apoptóticos. De acordo com Corriero *et al.* (2007), a presença de corpos apoptóticos no lúmen indica eliminação desses fragmentos via papila urogenital. Em geral, os corpos apoptóticos e residuais das células germinativas são fagocitados pelas células de Sertoli (Chaves-Pozo *et al.*, 2005).

A caspase-3 é a principal protease executora do programa apoptótico, a qual ativa endonucleases e também é responsável pela quebra de proteínas estruturais citoplasmática conduzindo a alterações morfológicas típicas da apoptose (Huentterbrenner *et al.*, 2003). No presente estudo, o aumento dos níveis de HSP70 coincidiu com a diminuição da atividade enzimática da caspase-3 nos meses de junho a dezembro. Esse resultado permite inferir que HSP70 pode proteger as células germinativas de *P. argenteus* da apoptose dependente de caspase-3 quando essas células estão envolvidas com a produção espermática. É sabido que a HSP70 liga-se ao Apaf-1 promovendo sua inibição e assim, a ativação de caspase-9 e subseqüentemente a ativação de caspase-3 torna-se inviável. Além disso, HSP70 pode ligar-se ao AIF (apoptosis inducing factor) impedindo sua ação (Parcellier *et al.*, 2003).

De maneira geral, as HSP's podem atuar tanto na repressão quanto na promoção da apoptose associando-se com componentes-chaves da rota apoptótica (Parcellier *et al.*, 2003). Comparando-se os pontos de estudo, observamos que os níveis proteicos de HSP70 e a atividade enzimática da caspase-3 em testículo e fígado foram significativamente maiores nos peixes coletados em S1 no período chuvoso, o qual coincide com o pico da atividade reprodutiva. No entanto, não houve variação entre os pontos de coleta no período seco. Esses resultados sugerem que os níveis elevados de HSP70 reflete a plasticidade adaptativa dos peixes em resposta às condições adversas da água do hipolímnio liberada da barragem de Três Marias nos meses de novembro a fevereiro. Além disso, esse resultado permite inferir que a HSP70 pode ser utilizada como biomarcador de impacto ambiental, uma vez que é uma das primeiras proteínas de estresse a ser expressa sob efeito de qualquer fator impactante.

Assim, os dados obtidos no presente estudo amplia o conhecimento da espermatogênese de peixes neotropicais em ambiente naturais e podem contribuir para o avanço de estudos de biomonitoramento ambiental e conservação da ictiofauna, além de confirmar o uso de peixes teleósteos, especificamente *P. argenteus* como modelo de estudo em biologia celular no rio São Francisco.

6. Conclusões

- A atividade testicular de *P. argenteus* é afetada negativamente em S1 pela condição inadequada da água liberada pela UHE-TRM no período chuvoso;
- Após a confluência com o rio Abaeté (S2), machos de *P. argenteus* apresentam maior eficiência espermática e níveis plasmáticos de esteróides sexuais;
- As variações sazonais de HSP70 podem regular o balanço entre a proliferação e a morte celular (dependente de caspase-3) durante a espermatogênese de *P. argenteus*, contribuindo para a remodelação testicular após a época de reprodução;
- A HSP70 pode contribuir para a proteção das células germinativas durante a maior parte do período reprodutivo e pode ser utilizada como biomarcador de impacto ambiental;
- As análises morfométricas, os níveis de esteróides sexuais e os níveis proteicos de HSP70, PCNA e caspase-3 podem fornecer ferramentas para a avaliação da espermatogênese em populações naturais de peixes;
- O presente trabalho aliado aos estudos com fêmeas de *P. argenteus* confirma a importância de preservação do rio Abaeté, uma vez que esse tributário garante o sucesso reprodutivo e o possível recrutamento de novos indivíduos na região do Alto rio São Francisco.

7. Referências Bibliográficas

- Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM (2007) Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil, Maringá, Eduem, 501p
- Agostinho AA, Gomes LC, Veríssimo S, Okada EK (2004) Flood regime, dam regulation and fish in the upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Rev Fish Biol Fisher* 14:1-19
- Agostinho AA, Mendes VP, Suzuki HT, Canzi C (1993) Avaliação da atividade reprodutiva da comunidade de peixes dos primeiros quilômetros a jusante do reservatório de Itaipu. *Rev Unimar* 15 (1):175-189
- Alvarenga ER, França LR (2009) Effects of Different Temperatures on Testis Structure and Function, with Emphasis on Somatic Cells, in Sexually Mature Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biol Reprod* 80 (3):537-544
- Amer MA, Miura T, Miura C, Yamauchi K (2001) Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol Reprod* 65 (4):1057-1066
- Andreu-Vieyra CV, Buret AG, Habibi HR (2005) Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 146 (3):1588-1596
- Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N (2010) Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimata-pacu *Prochilodus argenteus* in the Sao Francisco River, downstream from the Tres Marias Dam, Southeastern Brazil. *Anim Reprod Sci* 118 (2-4):330-336
- Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N (2011a) Collapse of the reproductive process of two migratory fish (*Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*) in the Tres Marias Reservoir, Sao Francisco River, Brazil. *J Appl Ichthyol* 27 (3):847-853
- Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N (2011b) Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the "curimata-pacu" *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). *Gen Comp Endocr* 172 (3):400-408
- Barcellos LJG, Wassermann GF, Scott AP, Woehl VM, Quevedo RM, Ittzes I, Krieger MH, Lulhier F (2002) Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. *J Fish Biol* 61 (3):751-763

- Basu N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM, Iwama GK (2002) Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295:173-183
- Batlouni SR, Nobrêga R H, França LR (2009) Cell junctions in fish seminiferous epithelium. *Fish Physiol Biochem* 35 (1): 207-217
- Baum JS, St George JP, McCall K (2005) Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* 16 (2):245-259
- Batlouni SR, Romagosa E, Borella MI (2006) The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the seminiferous epithelium An approach addressed to aquaculture. *Anim Reprod Sci* 96 (1-2):116-132
- Bazzoli N (2003) Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial do rio São Francisco na região de Pirapora, MG. In: Godinho H P, Godinho AL (Eds), *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*, Belo Horizonte, PUC Minas, pp 293–306
- Beaumont HM, Mandl AM (1962) A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc Roy Soc London Ser B* 155:557-579
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Bravo R, Graf T (1985) Synthesis of the nuclear protein cyclin does not correlate directly with transformation in quail embryo fibroblasts. *Expl Cell Res* 156 (2):450-454
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, Mac Donald-Bravo H (1987) Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA-polymerase delta. *Nature* 326: 515-517
- Bravo R, MacDonald-Bravo H (1987) Existence of two populations of cyclin proliferating cell nuclear antigen during the cell-cycle-association with DNA-replication sites *J Cell Biol* 105:1549–1554
- Brito MFG, Bazzoli N (2003) Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the Sao Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zoo* 55 (5):624-633
- Carnevali O, Maradonna F (2003) Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. *Gen Comp Endocr* 131:203-209

- Castro RMC, Vari RP (2004) The South American Characiform Family Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. *Smithsonian Cont Zool* 622:1-189
- Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J, Ayala AG (2005) An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biol Reprod* 72 (3):593-601
- Chaves-Pozo E, Liarte S, Vargas-Chacoff L, García-López A, Mulero V, Meseguer J, Mancera JM, García-Ayala A (2007) 17 β -Estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males. *Biol Reprod* 76:142-148
- Cobb J, Handel MA (1998) Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. *Semin Cell Dev Biol* 9 (4):445-450
- Corriero A, Desantis S, Bridges CR, Kime DE, Megalofonou P, Santamaria N, Cirillo F, Ventriglia G, Di Summa A, Deflorio M, Campobasso F, De Metrio G (2007) Germ cell proliferation and apoptosis during different phases of swordfish (*Xiphias gladius* L.) spermatogenetic cycle. *J Fish Biol* 70:83-99
- Currie S (2011) Heat Shock Proteins and Temperature, In: Farrell AP (Ed) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, Academic Press, San Diego, pp 1732-1737
- Deane EE, Woo NYS (2011) Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. *Rev Fish Biol Fisher* 21:153-185
- Delaney MA, Klesius PH (2004) Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 236:633-644
- de Waal PP, Leal MC, García-López A, Liarte S, de Jonge H, Hinfray N, Brion F, Schulz RW, Bogerd J (2009) Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. *J Endocrinol* 202:287-297
- Dolbeare F (1995). Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine. Part I. Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J* 27:339-369
- Domingos FFT, Thomé RG, Arantes FP, Castro ACS, Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E. (2012) Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in area of influence of a tributary,

- downstream from a hydroelectric power dam, Brazil. *Fish Physiol Biochem* DOI 10.1007/s10695-012-9668-3
- Eddy EM (1999) Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 4:23-30
- Esteves, FA, Amorim JC, Cardoso AL, Barbosa FAR (1985) Caracterização limnológica preliminar da represa de Três Marias (MG) com base em alguns parâmetros ambientais básicos. *Ciênc Cult* 37 (4):608-617
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243-282
- Fischer H, Rossiter H, Ghannadan M, Jaeger K, Barresi C, Declercq W, Tschachler E, Eckhart L (2005) Caspase-14 but not caspase-3 is processed during the development of fetal mouse epidermis. *Differentiation* 73:406-413
- Franco A, Jouaux A, Mathieu M, Sourdain P, Lelong C, Kellner K, Berthelin CH (2010) Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell Tissue Res* 340:201-210
- Gazola R, Borella MI (1997) Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, characidae). *Braz J Med Biol Res* 30 (12):1485-1487
- Godinho H P, Godinho AL (2003) Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais, Belo Horizonte, PUC Minas, 468p
- Gonçalves TL, Bazzoli N, Brito MFG, (2006) Gametogenesis and reproduction of the matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) (Pisces: Characidae) in the São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. *Braz J Biol* 66 (2A):513-522
- Grier HJ (1993) Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier, In: Russell LD, Griswold MD (Eds) *The Sertoli cell*, Clearwater, Cache River Press, pp 704-739
- Grier HJ (2002) The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes, In: Creswell RL (Ed) *Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, Fort Pierce, Mississippi/Alabama Sea, Grant Consortium, pp 537-552

- Grier HJ, Lo Nostro F (2000) The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept, In: Noberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO (Eds) Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Norway, University of Bergen, pp 233-236
- Grier HJ, Uribe-Aranzábal MC (2009) The testis and spermatogenesis in teleosts, In: Jamieson, BGM (Ed.) Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes), Science Publishers, New Hampshire, Endfield, NH, USA, pp. 119–142
- Gubiani EA, Gomes LC, Agostinho AA, Baumgartner G (2010) Variations in fish assemblages in a tributary of the upper Paraná River, Brazil: A comparison between pre and post-closure phases of dams. Riv Res Appl 26:848-865
- Haider SG (2004) Cell biology of Leydig cells in the testis. Int Rev Cytol 233:181-241
- Haider SG (2007) Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria. Endocrinol 148 (6):2581-2582
- Halls PA, Woods AL (1990) Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. Cell Prolif 23 (6):505-522
- Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L (2000) Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. Cell Prolif 33:341-365
- Hikim APS, Swerdloff RS (1999) Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. Rev Reprod 4 (1):38-47
- Huettenbrenner S, Maier S, Leisser C, Polgar D, Strasser S, Grusch M, Krupitza G (2003) The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. Mut Res 7705:1-15
- Ito LS, Yamashita M, Takahashi C, Strüssmann CA (2003) Gonadal degeneration in sub-adult male pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during exposure to warm water. Fish Physiol Biochem 28 (1-4):421–423
- Jamieson BGM (1991) Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Rev Fish Biol Fisher 2:320
- Janz DM, McMaster ME, Munkittrick KR, Van Der Kraak G (1997) Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. Toxicol Appl Pharm 147 (2):391-398

- Janz DM, McMaster ME, Weber LP, Munkittrick KR, Van Der Kraak G (2001) Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis, and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent. *Can J Fish Aquat Sci* 58 (3):620-625
- Kamaruddin M, Kroetsch T, Basrur PK, Hansen PJ, King WA (2004) Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia* 36:327-334
- Kerr JFR, Willie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: basis biological phenomenon with wide ranging implicatons in tissue kinetics. *British J Cancer* 26:239-257
- Kiang JG, Tsokos GC (1998) Heat shock proteins 70kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 80:183-201.
- Koulish S, Kramer CR, Grier HJ (2002) Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J Morphol* 254:292-311
- Krumschnabel G, Podrabsky, JE (2009) Fish as model systems for the study of vertebrate apoptosis. *Apoptosis* 14 (1):1-21
- Le Gac F, Loir M (1999) Male reproductive system fish, In: Knobil E, Neill JD (Eds) *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press, San Diego, pp 20–30
- Loppion G, Crespel A, Martinez AS, Auvray P, Sourdain P (2008) Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, *Scyliorhinus canicula* L. *Cell Tissue Res* 332 (3):533-542
- Mattei XP (1993) Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. *J Fish Biol* 43 (6): 931-937
- Magalhães ALB, Andrade RF, Gomes BVC, Perini VR, Rizzo E, Bazzoli N (2011) Ultrastructure of the semicyclic spermatogenesis in the South American freshwater characid *Hemigrammus marginatus* (Teleostei, Characiformes). *J Appl Ichthyol* 27 (4):1041-1046
- Mc Clusky LM (2005) Stage and season effects on cell cycle and apoptotic activities of germ cells and Sertoli cells during spermatogenesis in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Reproduction* 129:89-102
- Mc Clusky LM, Barnhoorn IEJ, van Dyk JC, Bornman MS (2008) Testicular apoptosis in feral *Clarias gariepinus* using TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry. *Ecotox Environ Safe* 71 (1):41–46

- Migliarini B, Campisi AM, Maradonna F, Truzzi C, Annibaldi A, Scarponi G, Carnevali O (2005) Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine teleost *Gobius niger*. *Gen Comp Endocrinol* 142 (1-2):241–247
- Miyachi K, Frizler MJ, Tan EM (1978) Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121:2228-2234
- Miura T, Higuchi M, Ozaki Y, Ohta T, Miura C (2006) Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Dev Biol* 103 (19):7333-7338
- Miura T, Miura C, Ohta T, Nader MR, Todo T, Yamauchi K (1999) Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Com* 264 (1):230-234
- Miura C, Miura T, Yamashita M (2002) PCNA protein expression during spermatogenesis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Zool Sci* 19 (1):87-91
- Miura T, Ohta T, Miura C, Yamauchi K (2003) Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* 144 (12):5504-5510
- Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12:3788-3796
- Nagahama Y (1994) Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol* 38: 217-229
- Nóbrega RH, Quagio-Grassiotto I (2007) Morphofunctional changes in Leydig cells throughout the continuous spermatogenesis of the freshwater teleost fish, *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes, Characidae): an ultrastructural and enzyme study. *Cell Tissue Res* 329 (2):339-349
- Nóbrega RH, Batlouni SR, França LR (2009) An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem* 35 (1):197–206
- Ohta T, Miyake H, Miura C, Kamei H, Aida K, Miura T (2007) Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Biol Reprod* 77 (6):970-977
- Padmini E, Rani MU (2008) Impact of seasonal variation on HSP70 expression quantitated in stressed fish hepatocytes. *Biochem Biophys Res B* 151:278-285

- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C (2003) Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 304:505-512
- Patrus MLRA, Figueredo VLS, Matos AR, Santos ACS, Menezes ICR (2001) Parcela Mineira da Bacia do São Francisco: caracterização hidroclimática e avaliação dos Recursos Hídricos de Superfície, In: Pinto CP, Martins-Neto M (Eds) *Bacia do São Francisco: Geologia e recursos naturais*, Belo Horizonte, SBG-MG, pp 93–138
- Piechotta G, Lacorn M, Lang T, Kammann U, Simat T, Jenke HS, Steinhart H (1999) Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) as possible new biomarker for anthropogenic stress. *Ecotox Environ Safe* 42 (1):50-56
- Porter CM, Janz DM (2003) Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. *Ecotox Environ Safe* 54 (2):199-206
- Pudney J (1995) Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. *Microsc Res Tech* 32:459-497
- Pudney J (1999) Leydig and Sertoli cells, nonmammalian Knobil E, Neill JD (Eds) *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press, San Diego, pp 1008 –1020
- Reis E, Kullander SO, Ferraris JCJ (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America, PUC-RJ, Porto Alegre, 729p
- Sampaio EV, López CM (2003) Limnologias física, química e biológica da represa de Três Marias e do São Francisco, In: Godinho HP, Godinho AL (Eds), *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*, Belo Horizonte, PUC Minas, pp 71-92
- Sampaio EV, Sato Y (2006) A ictiofauna na região do Alto São Francisco, com ênfase no reservatório de Três Maria, Minas Gerais, In: Nogueira, MG, Henry, R, Jorcin, A (Eds) *Ecologia de reservatórios – Impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata*, 2º Ed, São Carlos, Rima, pp 251-274
- Santos HB, Sato Y, Moro L, Bazzoli N, Rizzo E (2008a) Relationship among follicular apoptosis, integrin $\beta 1$ and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. *Cell Tissue Res* 332 (1):159–170
- Santos HB, Thomé RG, Arantes FP, Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E (2008b) Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in

- Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology* 70 (9):1449-1460
- Sarge KD, Cullen KE (1997) Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci* 53:191-197
- Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E, Boschi MB, Miranda MOT (2005) Influence of the Abaete River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the Sao Francisco River, downstream from the Tres Marias Dam, southeastern Brazil. *River Res Appl* 21 (8):939-950
- Sato Y, Cardoso EL, Godinho AL, Godinho HP (1996) Hypofisiation parameters of the fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station conditions. *Rev Bras Biol* 56:59-64
- Sato Y, Godinho HP (2003) Migratory fishes of the São Francisco River, In: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A (Eds) *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*, World Fisheries Trust/The World Bank/International Development Research Centre, Victoria, pp 195–222
- Schulz RW, França LR, Lareyre JJ, Legac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T (2010) Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocr* 165 (3):390-411
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR, Godinho HP (2005) Sertoli cell proliferation in the adult testis - Evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod* 73 (5):891-898
- Schulz RW, Miura T (2002) Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem* 26 (1):43-56
- Schulz RW, Nobréga RH (2011a) Anatomy and Histology of Fish Testis, In: Farrell AP (Ed) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, Academic Press, San Diego, pp. 616–626
- Schulz RW, Nobréga RH (2011b) Regulation of Spermatogenesis, In: Farrell AP (Ed) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, Academic Press, San Diego, pp 627–634
- Schulz RW, van Dijk W, Chaves-Pozo E, García-López A, França LR, Bogerd J (2012) Sertoli cell proliferation in the adult testis is induced by unilateral gonadectomy in African catfish. *Gen Comp Endocr* 177 (1):160-167
- Scott JAP, Sumpter P, Stacey N (2010) The role of the maturation-inducing steroid, 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *76* (1):183-224
- Takle H, Andersen Ø (2007) Caspases and apoptosis in fish. *J Fish Biol* 71:326-349

- Thomé RG, Domingos FFT, Santos HB, Martinelli PM, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N (2012) Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue Cell* 44:54-62
- Thomé RG, Santos HB, Arantes FP, Domingos FFT, Bazzoli N, Rizzo E (2009) Dual roles for autophagy during follicular atresia in fish ovary. *Autophagy* 5 (1):117-119
- Thomé RG, Santos HB, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N (2010) Distribution of laminin beta 2, collagen type IV, fibronectin and MMP-9 in ovaries of the teleost fish. *J Mol Histol* 41 (4-5):215-224
- Tripathi R, Mishrab DP, Shaha C (2009) Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *J Reprod Immunol* 83:31-35
- Vilela DAR, Silva SGB, Peixoto MTD, Godinho HP, França LR (2003) Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiol Biochem* 28 (1-4):187-190
- Volpe S, Galeati G, Bernardini C, Tamanini C, Mari G, Zambelli D, Seren E, Spinaci M (2008) Comparative immunolocalization of heat shock proteins (Hsp)-60, -70, -90 in boar, stallion, dog and cat spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 43:385-392
- Wang Y, Xu J, Sheng L, Zheng Y (2007) Field and laboratory investigations of the thermal influence on tissue-specific Hsp70 levels in common carp (*Cyprinus carpio*) *Comp Biochem Phys A* 148:821-827
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen O, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B (2004) The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp Biochem Phys A* 137 (3):447-477
- Weber LP, Janz DM (2001) Effect of β -naphthoflavone and dimethylbenz[*a*]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquat Toxicol* 54 (1-2):39-50
- Weber LP, Kiparissis Y, Hwang GS, Niimi AJ, Janz DM, Metcalfe CD (2002) Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Phys C* 131 (1):51-59
- Wu RSS, Zhou BS, Randall DJ, Woo NYS, Lam PKS (2003) Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction. *Environ Sci Technol* 37 (6):1137-1141

- Wu YJ, Pei YL, Qin YH (2011) Developmental expression of heat shock proteins 60, 70, 90, and A2 in rabbit testis. *Cell Tissue Res* 344:355-363
- Yamada H, Satoh R, Ogoh M, Takaji K, Fujimoto Y, Hakuba T, Chiba H, Kambegawa, A, Iwata M (2002) Circadian changes in serum concentrations of steroids in Japanese char *Salvelinus leucomaenis* at the stage of final maturation *Zool Sci (Tokyo)* 19 (8):891-898
- Yoo JL, Janz DM (2003) Tissue-specific HSP70 levels and reproductive physiological responses in fish inhabiting a metal-contaminated Creek. *Arch Environ Con Tox* 45:110-120
- Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur, Kah O (2010) Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 65 (3):438-55