

LEONARDO JOSÉ ALVES DE FREITAS

BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO DOURADO
***Salminus franciscanus* NO RIO SÃO FRANCISCO,**
A JUSANTE DA BARRAGEM DE TRÊS MARIAS:
ESTUDO HISTOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL

Orientadora: Dra. Elizete Rizzo.

Coorientador: Dr. Nilo Bazzoli.

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2012

LEONARDO JOSÉ ALVES DE FREITAS

BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO DOURADO
***Salminus franciscanus* NO RIO SÃO FRANCISCO,**
A JUSANTE DA BARRAGEM DE TRÊS MARIAS:
ESTUDO HISTOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Elizete Rizzo.
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador: Dr. Nilo Bazzoli.
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2012

Freitas, Leonardo José Alves de.

Biologia da reprodução do dourado *Salminus franciscanus* no rio São Francisco, a jusante da barragem de Três Marias: estudo histológico, imunohistoquímico e ultraestrutural. [manuscrito] / Leonardo José Alves de Freitas. – 2012.

49 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Elizete Rizzo. Coorientador: Nilo Bazzoli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.
Departamento de Morfologia.

1. Peixe – Reprodução – Teses. 2. Dourado (Peixe) – Teses. 3. *Salminus franciscanus* – Teses. 4. Peixe - São Francisco, Rio – Teses. 5. Microscopia eletrônica - Teses. 6. Imunohistoquímica - Teses. 7. Biologia celular – Teses. I. Rizzo, Elizete. II. Bazzoli, Nilo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Morfologia. IV. Título.

CDU: 597-8



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE
LEONARDO JOSÉ ALVES DE FREITAS**

221/2012/13
entrada
2º/2010
2010720711

Às **quatorze horas** do dia **13 de julho de 2012** reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO DOURADO *Salminus franciscanus* NO RIO SÃO FRANCISCO, A JUSANTE DA BARRAGEM DE TRÊS MÁRIAS: ESTUDO HISTOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL”**, requisito final para obtenção do Grau de Mestre 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	<i>aprovado</i>
Dr. Nilo Bazzoli	PUCMinas	<i>aprovado</i>
Dr. Fábio Pereira Arantes	PUCMinas	<i>APROVADO</i>
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	<i>APROVADO</i>

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, 13 de julho de 2012.**

Dra. Elizete Rizzo _____
(orientadora)

Dr. Nilo Bazzoli _____
(co-orientador)

Dr. Fábio Pereira Arantes _____

Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida _____

Cleide Oliveira
Prof. Cleide 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

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia (ICB/UFMG) sob orientação da Professora Dra. Elizete Rizzo e coorientação do Professor Dr. Nilo Bazzoli.

O trabalho foi desenvolvido com o apoio da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (CODEVASF-MG) e do Centro de Microscopia da UFMG (CM-UFMG) e com a colaboração de Dr. Fábio Arantes e Dr. Yoshimi Sato.

Suporte financeiro:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por simplesmente tudo na minha vida, porque sem Ele eu não teria chegado até aqui;

À minha orientadora, professora Dra. Elizete Rizzo, pela paciência, orientação, profissionalismo, oportunidades na realização deste trabalho, apoio e por ter me recebido como seu aluno;

A toda minha amada família, em especial: minha mãe, Stelita, pelo belo exemplo de amor, dedicação, doação e paciência; meu querido irmão, Elvis, por ser mais que irmão, mas um grande amigo; à Paula, pelo amor, dedicação, ajuda, companheirismo e incentivo para que eu seguisse pela carreira acadêmica;

Ao Dr. Nilo Bazzoli, pelas sugestões e pelas viagens para as coletas em Três Marias;

Aos amigos do Laboratório: Moniquinha, pela amizade, conversas, companhia e todo apoio no trabalho; Paula, pela amizade, ajuda e contribuição; Violet, pela alegria, positividade e amizade; Ralph e Fabrício, pela paciência em ajudar; Yuri e Rafael (Rafoso), pelas parcerias e descontração nas aulas; Paulinha, Claudinha e Luis, pela companhia e momentos agradáveis;

Aos meus amigos: Robertinha, pela amizade, conversas, almoços no Bandeirão, desabafos; Son, pelas conversas e amizade; Marquinhos, pelo apoio e conversas acadêmicas; Jonatas, pelo exemplo de amizade; amigos da IBE, em especial Rafa, Renato, Assis, Marineide e Diego;

Aos colegas de campo: Bode, Zeferino, Rato, Talin e Pedro, pelas experiências de campo nas coletas em Três Marias e momentos engraçados;

Aos colegas da PUC Minas, pelas contribuições, em especial ao Dr. Fábio Arantes;

Aos funcionários da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, em especial ao Dr. Yoshimi Sato;

Aos colegas da Pós-graduação em Biologia Celular: Alesandra, Rose, Priscila, Patrícia, pelos momentos de aprendizado e alegria; Sibeles, pela recepção no Programa;

Aos colegas do Centro de Microscopia da UFMG: Roberta, Kinulpe, Rubens, Elizabeth, pela ajuda na preparação de amostras;

Aos professores da Pós-graduação, pelas experiências e ensinamentos compartilhados;

Aos colegas da Comissão Organizadora do IV SBC, pelos momentos de cooperação e superação;

Enfim, a todos agradeço profundamente, afinal, sou o que sou hoje pela contribuição de cada um de vocês.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	iii
INTRODUÇÃO	1
RIO SÃO FRANCISCO	1
ORGANIZAÇÃO TESTICULAR	2
ORGANIZAÇÃO OVARIANA	3
ATRESIA FOLICULAR	3
BIOLOGIA REPRODUTIVA	4
PROLIFERAÇÃO, MORTE CELULAR E IGF1	5
ESPÉCIE EM ESTUDO	7
OBJETIVO GERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIAIS E MÉTODOS	9
ÁREA DE ESTUDO	9
AMOSTRAGENS DOS PEIXES	10
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA	10
HISTOLOGIA E MORFOMETRIA	10
MICROSCOPIA ELETRÔNICA	11
FECUNDIDADE	12
REAÇÃO DE TUNEL <i>IN SITU</i>	12
IMUNO-HISTOQUÍMICA	12
ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
RESULTADOS	14
PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DOS PEIXES	14
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA	15
FOLICULOGÊNESE, ULTRAESTRUTURA DE OVÓCITOS E FECUNDIDADE	16
ESPERMATOGÊNESE E ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS	17
MATURAÇÃO GONADAL E ATIVIDADE REPRODUTIVA	18
RELAÇÃO ENTRE IGS E K	19
REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS E TUNEL	20
DISCUSSÃO	30
PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DOS PEIXES E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA	30
FOLICULOGÊNESE E FECUNDIDADE	31
ESPERMATOGÊNESE	34
ATIVIDADE REPRODUTIVA E MATURAÇÃO GONADAL	35
PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR E EXPRESSÃO DE IGF1	36
CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

Estudos sobre a biologia reprodutiva de uma espécie em seu ambiente natural fornecem suporte para o desenvolvimento da piscicultura com espécies nativas e fornecem parâmetros essenciais para o estabelecimento de programas de conservação de peixes. Um total de 283 exemplares do dourado *Salminus franciscanus* foram capturados no alto rio São Francisco, a jusante da barragem de Três Marias, Minas Gerais, durante um ciclo reprodutivo de agosto de 2009 a julho de 2010. Os estádios de maturação gonadal e tipo de desova foram determinados por características histológicas das gônadas, desenvolvimento das células germinativas e variações do índice gonadossomático (IGS). Para a análise da superfície do ovócito e fecundidade, fêmeas adultas foram submetidas à desova induzida por hipofiseção. As fêmeas foram significativamente maiores do que os machos e houve uma acentuada predominância de machos em todas as coletas. A relação peso-comprimento indicou um crescimento alométrico positivo para as fêmeas ($b = 3,23$) e crescimento isométrico para machos ($b = 3,04$), refletindo o grande investimento das fêmeas na reprodução. Peixes em repouso (estádio 1) foram comuns em todas as coletas. Peixes em maturação e desova/espermição (estádios 2 e 3) foram predominantes em outubro-novembro e dezembro-janeiro e a fase pós-desova/pós-espermição (estádio 4) ocorreu a partir de dezembro-janeiro até abril-maio. O IGS seguiu as alterações morfológicas de maturação gonadal, com um pico (IGS máximo 7,08 em fêmeas e 3,46 em machos) em outubro-novembro. Por microscopia eletrônica de varredura, os ovócitos exibiram, após a desova, uma micrópila em forma de funil e um arranjo simples de poros-canais na zona radiata, que é típico em ovos não adesivos. A fecundidade absoluta variou de 167.048 a 440.320 ovos liberados por fêmea, e a fecundidade relativa de 3.341 a 7.102 ovos/cm (CT) e de 129 a 175 ovos/g (PC), com coeficiente de regressão linear $R^2 = 86,14$. As reações imuno-histoquímicas e TUNEL sugeriram um relacionamento entre IGF1 e os processos de proliferação celular e apoptose na regulação da espermatogênese de *S. franciscanus*. Em resumo, os resultados deste estudo indicam que *S. franciscanus* se reproduz no alto rio São Francisco de outubro a janeiro, apresentando desova total, ovos não adesivos e alta fecundidade, parâmetros reprodutivos de peixes desovadores pelágicos, que espalham seus ovos e não cuidam da prole, um estilo reprodutivo considerado ancestral na evolução dos peixes.

Palavras-chaves: reprodução, *Salminus franciscanus*, rio São Francisco, microscopia eletrônica, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Studies on the reproductive biology of a species in its natural environment provide support for development of fish farming with native species and essential parameters for the establishment of fish conservation programs. A total of 283 specimens of the dourado *Salminus franciscanus* were captured in upper São Francisco River, downstream from the Três Marias dam, Minas Gerais, southeastern Brazil, during a reproductive cycle from August 2009 to July 2010. The gonadal maturity stages and spawning type were determined by histological features of the gonads, germ cell development and variations of the gonadosomatic index (GSI). For analysis of the oocyte surface and fecundity, mature females were subjected to induced spawning by hypophysation. Females were significantly larger than males and there was a marked predominance of males in all samples. The length-weight relationship showed positive allometric growth for females ($b = 3.23$) and isometric growth for males ($b = 3.04$), reflecting the great investment of females in breeding. Fish at resting (stage 1) were common in all samples, maturation and spawning (stages 2 and 3) were predominant in October-November and December-January and post-spawning (stage 4) occurred from December-January extending until April-May. The GSI followed the morphological changes of gonadal maturation, with a peak (7.08 in females and 3.46 in males) in October-November. By scanning electron microscopy, spawned oocytes showed a funnel-shaped micropyle and a simple arrangement of pore-canals in the zona radiata, which is typical in non-adhesive eggs. Absolute fecundity (AF) ranged of 167,048 to 440,320 oocytes per female and, relative fecundity was 3,341 to 7,102 oocytes/cm (TL) and 129 to 175 oocytes/g (BW), with coefficient of liner regression $R^2 = 86.14$. Immunohistochemical and TUNEL reactions suggested a relationship among IGF1, cell proliferation and apoptosis in the regulation of the spermatogenesis of *S. franciscanus*. In summary, the results of this study indicate that *S. franciscanus* reproduces in upper São Francisco River from October to January, exhibiting total spawning, non-adhesive eggs and high fecundity, reproductive parameters of nonguarding, egg-scattering pelagic spawners, a reproductive style considered ancestral in the evolution of fishes.

Keywords: reproduction, *Salminus franciscanus*, São Francisco River, electron microscopy, immunohistochemistry.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Dados biométricos e índices biológicos de fêmeas e machos de dourado <i>S. franciscanus</i> em dois trechos do alto rio São Francisco.....	14
Tabela 2: Parâmetros físico-químicos da água do alto rio São Francisco	15
Tabela 3: Fecundidade absoluta e fecundidade relativa ao peso corporal e ao comprimento total de fêmeas de <i>S. franciscanus</i>	17
Tabela 4: Frequências dos estádios de maturação gonadal de <i>S. franciscanus</i> , regiões antes e após a confluência do rio Abaeté.....	19
Figura 1: Mapa de localização da área de estudo	9
Figura 2: Relação peso-comprimento total para fêmeas e machos de <i>S. franciscanus</i>	15
Figura 3: Frequências relativas dos estádios de maturação gonadal por bimestre de fêmeas e machos de <i>S. franciscanus</i>	19
Figura 4: Secções histológicas de ovários de <i>S. franciscanus</i>	21
Figura 5: Ultraestrutura dos folículos ovarianos de <i>S. franciscanus</i>	23
Figura 6: Superfície de ovócitos ovulados de <i>S. franciscanus</i>	24
Figura 7: Secções histológicas de testículos de <i>S. franciscanus</i>	25
Figura 8: Ultraestrutura das células espermatozóides de <i>S. franciscanus</i>	26
Figura 9: Índice gonadosomático (IGS) e fator de condição de Fulton (K) por estádio de maturação gonadal para fêmeas e machos de <i>S. franciscanus</i>	27
Figura 10: Índice gonadosomático (IGS) e fator de condição de Fulton (K) por bimestre para fêmeas e machos de <i>S. franciscanus</i>	28
Figura 11: Reações imuno-histoquímicas para PCNA, TUNEL e imuno-histoquímica para IGF1, durante as fases de desenvolvimento testicular de <i>S. franciscanus</i>	29

INTRODUÇÃO

RIO SÃO FRANCISCO

O rio São Francisco (RSF) nasce na serra da Canastra, sudoeste do estado de Minas Gerais, e percorre cerca de 2.800 Km em território brasileiro para desembocar no oceano Atlântico, entre os estados de Alagoas e Sergipe, nordeste do Brasil (GODINHO & GODINHO, 2003). É um rio de grande importância econômica, social e cultural nos estados que percorre. Folcloricamente, é citado em várias canções e nas lendas em torno de suas carrancas.

Conhecido como o “Velho Chico”, o rio da unidade nacional, o RSF tem sido impactado pela construção de vários empreendimentos hidrelétricos, e os grandes lagos artificiais formados interferiram na geomorfologia do rio, principalmente na região da cachoeira de Paulo Afonso, na Bahia. Além das barragens, suas águas têm sido usadas para agricultura, poluídas por indústrias, e o plano nacional de transposição deste rio afetará ainda mais todo o seu ecossistema e sua ictiofauna. Historicamente, o RSF foi uma das principais fontes brasileiras de pescado. Este fornecia peixes para sua população ribeirinha e para atender o mercado principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. Nas últimas décadas, a produção pesqueira no alto e médio São Francisco vem diminuindo drasticamente, e o colapso pesqueiro é sentido pela sua população ribeirinha (SATO & GODINHO, 1999).

Os principais afluentes do RSF incluem os rios Pará, Paraopeba, Abaeté, das Velhas, Jequitaiá, Paracatu, Urucuia, Verde Grande, Carinhanha, Corrente e Grande. Destes, os rios das Velhas e Paraopeba são os mais intensamente poluídos e degradados por esgoto doméstico e industrial, principalmente das mineradoras da Grande Belo Horizonte. O rio Abaeté é um afluente de porte médio, localizado na margem esquerda do rio e que desemboca cerca de 30 Km da barragem de Três Marias, MG (SATO & GODINHO, 2003).

A ictiofauna da bacia do rio São Francisco inclui 173 espécies de peixes de água doce (DRUMMOND *et al.*, 2005), apresentando alto grau de endemismo, e cerca de 8% destas espécies são migradoras (SATO & GODINHO, 2003). As principais ameaças a essa rica fauna de peixes são: desmatamento das matas ciliares, construção de grandes barragens de hidrelétricas, poluição industrial, doméstica e agrícola, garimpo, extrativismo mineral, pesca predatória, destruição de várzeas e lagoas marginais e introdução de espécies novas (SATO & GODINHO, 1999; GODINHO & GODINHO, 2003).

A migração ocorre como um fenômeno frequente na maioria dos rios da América do Sul. Os peixes, que migram, sobem anualmente pelo rio principal ou por tributários até atingir os locais apropriados para a desova. Fenômeno cíclico, a migração acontece principalmente entre outubro e janeiro, na estação chuvosa, quando os níveis de água, temperatura e fotoperíodo aumentam (SATO & GODINHO, 2003). Os peixes migradores do RSF exibem desenvolvimento ovocitário do tipo grupo-sincrônico, desovam em um curto período reprodutivo e são iteróparos, ou seja, desovam por vários anos (BAZZOLI, 2003).

ORGANIZAÇÃO TESTICULAR

Nos peixes, os testículos são geralmente órgãos pares, revestidos por cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, que emite septos para o interior do órgão, de modo a delimitar os compartimentos tubular e intersticial. O compartimento tubular é formado por células da linhagem germinativa associadas às células de Sertoli, formando os cistos espermatogênicos (ou espermatocistos), que são unidades funcionais do testículo, sendo suportadas pela membrana basal dos túbulos seminíferos (GRIER, 1981; PARENTI & GRIER, 2004). Além de formar a parede dos cistos, as células de Sertoli desempenham várias funções, incluindo nutrição e sustentação das células germinativas; fagocitose de espermatozoides residuais, corpos residuais da espermiogênese e corpos apoptóticos; produção de hormônios esteroides e fatores de crescimento (SCHULZ & MIURA, 2002; SCHULZ *et al.*, 2005).

Ao contrário dos mamíferos, na maioria dos teleósteos, o crescimento do testículo é contínuo, mesmo depois da maturidade sexual, acompanhando o aumento do peso corporal, sendo que a proliferação e os prolongamentos de células de Sertoli dão suporte para o desenvolvimento das células germinativas e crescimento do testículo (KOULISH *et al.*, 2002; SCHULZ & MIURA, 2002). Nas regiões intersticiais dos testículos encontram-se as células de Leydig, produtoras de esteroides sexuais, associadas a capilares sanguíneos, fibras nervosas, além de fibroblastos, mastócitos, macrófagos e células mioides (SCHULZ *et al.*, 2010).

ORGANIZAÇÃO OVARIANA

Nas fêmeas dos teleósteos, os ovários são geralmente pares, revestidos também por túnica albugínea de natureza conjuntiva, que forma as lamelas ovulíferas, nas quais se encontram os folículos em diferentes fases de desenvolvimento. Unidades funcionais dos ovários, os folículos ovarianos são formados por ovócito circundado por camada de células foliculares apoiadas em membrana basal justaposta a um tecido mesenquimal, que se diferencia em teca conjuntiva (MAZAUD *et al.*, 2005).

Após a desova, os ovários apresentam folículos pós-ovulatórios e atrésicos que sofrem involução progressivamente até a recuperação total dos ovários, os quais voltam para a fase de repouso para iniciar novo ciclo reprodutivo (BAZZOLI, 2003; LUBZENS *et al.*, 2010). Os folículos pós-ovulatórios, constituídos de células foliculares, membrana basal e teca conjuntiva, são importantes indicativos do sucesso reprodutivo e são utilizados na determinação do tempo e frequência da desova de uma espécie (SATO *et al.*, 2005).

ATRESIA FOLICULAR

É um fenômeno comum nos ovários dos vertebrados, ocorrendo de forma natural e em condições experimentais e que leva à eliminação do ovócito antes ou após a desova. Ela pode ser causada por hipofisectomia, deficiência nutricional, mudanças bruscas de temperatura, estresse ambiental e mudanças hormonais (RIZZO & BAZZOLI, 1995). O processo pode também ocorrer em cativeiro, sendo predominante em folículos vitelogênicos, mas também pode afetar folículos pré-vitelogênicos e perinucleolares (MIRANDA *et al.*, 1999). Os principais eventos da atresia folicular incluem a fragmentação do envoltório nuclear do ovócito, alterações de organelas citoplasmáticas, liquefação do vitelo, culminando com fragmentação da zona pelúcida e hipertrofia das células foliculares (SANTOS *et al.*, 2005; LUBZENS *et al.*, 2010). Tal processo degenerativo pode ser essencial para a homeostase do ovário em maturação ou ocorrer no período após a desova, indicando o fim do período reprodutivo (KRYSKO *et al.*, 2008). Fêmeas mantidas em cativeiro e que não desovaram apresentam muitos folículos atrésicos em regressão, sendo o processo de reabsorção folicular prolongado, variando de sete meses em *Astyanax bimaculatus* (de dezembro a junho), e quatro meses em *Leporinus reinhardti* (de março a junho) (MIRANDA *et al.*, 1999).

BIOLOGIA REPRODUTIVA

Estudos da biologia reprodutiva fornecem parâmetros essenciais para conservação da biodiversidade e também para o cultivo de espécies de interesse comercial. Fatores ambientais atuam no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal controlando a gametogênese, maturação gonadal e desova das espécies (NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008). Diversas estratégias reprodutivas têm sido reportadas dentre os peixes Characiformes, especialmente na família Characidae permitindo adaptações aos diferentes habitats de água doce (LOWE-MCCONNELL, 1987). A fecundidade avalia o potencial reprodutivo de uma espécie e pode ser estimada pelo número de ovócitos vitelogênicos nos ovários antes da desova permitindo comparações entre populações e prognósticos reprodutivos da espécie (BAGENAL & BRAUM, 1978). Em peixes, a fecundidade aumenta com o tamanho corporal, está relacionada negativamente com o diâmetro ovocitário e pode variar entre populações de uma mesma espécie em função da disponibilidade de alimentos, e a fecundidade reduzida de uma espécie tem sido relacionada com diferentes tipos de impacto ambiental (BAGENAL & BRAUM, 1978; ARANTES *et al.* 2010; MELO *et al.*, 2011b).

Em geral, espécies migradoras se reproduzem em ambientes lóticos, são especialistas e apresentam desova total, curta estação reprodutiva sincronizada com o período chuvoso, ovos não adesivos e de pequeno tamanho, alta fecundidade e não cuidam da prole (SATO *et al.*, 2003). Por outro lado, espécies de ambientes lênticos são generalistas, apresentam desovas múltiplas, prolongada estação reprodutiva, ovos de tamanhos variados com algum grau de adesividade, fecundidade variável e podem apresentar comportamento de cuidado parental (GODINHO *et al.*, 2010).

As variações de comprimento e peso corporal, bem como a relação peso-comprimento, permitem avaliar como a espécie obtém alimento no seu habitat, indicando condições fisiológicas dos indivíduos em relação ao acúmulo de gordura, desenvolvimento gonadal e adaptação ao ambiente (ALVARENGA *et al.*, 2006). O índice gonadossomático (IGS) é um importante indicador de atividade reprodutiva de peixes, fornecendo parâmetros biológicos para avaliar a maturação gonadal. O fator de condição de Fulton (K) é um índice que reflete a interação entre variáveis bióticas e abióticas na condição fisiológica dos peixes, sendo que as variações de K permitem comparar duas ou mais populações sob diferentes condições de disponibilidade de alimento, densidade populacional e temperatura da água (SATO *et al.*, 2005).

Na relação peso-comprimento, b está relacionado com o tipo de crescimento levando-se em conta que o tamanho do peixe aumenta em comprimento, enquanto que seu peso aumenta três vezes. Assim, quando $b = 3,0$, o crescimento é considerado isométrico, em que as dimensões corporais não variam muito durante o crescimento; mas quando é maior ou menor que 3,0, o crescimento é considerado alométrico positivo ou negativo (OLAYANIETO *et al.*, 2008).

A ultraestrutura das células espermatogênicas, dos ovócitos e ovos de peixes são parâmetros importantes para o cultivo e também para estudos filogenéticos, além de fornecer subsídios para compreensão da interação do ovo com o substrato (RIEHL & PATZNER, 1998). Diversos padrões de superfície ovocitária foram reportados dentre os peixes Characiformes da América do Sul, com especializações funcionais relacionadas com as estratégias reprodutivas das espécies (RIZZO *et al.*, 2002). No polo animal, ovos de peixes de fertilização externa possuem abertura especializada na zona radiata, a micrópila, que permite a fertilização, sem reação acrossômica (RIEHL, 1993; RIZZO & BAZZOLI, 1993).

Durante o desenvolvimento dos folículos ovarianos, a micrópila é ocluída por uma célula micropilar, o conjunto constitui o aparelho micropilar, cuja morfologia varia de acordo com a estratégia reprodutiva das espécies (RICARDO *et al.*, 1996). Na maioria dos peixes de fertilização externa, a micrópila apresenta forma de funil e permite a passagem de somente um espermatozoide durante a fertilização (REDDING & PATIÑO, 1993). Além de bloquear a polispermia, o fechamento do canal micropilar pode levar à perda da viabilidade dos ovos de peixes alguns minutos após a desova, problema frequente na piscicultura quando ovócitos são submetidos à estocagem por curto tempo antes da fertilização (RIZZO *et al.*, 2003).

PROLIFERAÇÃO, MORTE CELULAR E IGF1

O desenvolvimento testicular de vertebrados requer coordenação espaçotemporal do processo espermatogênico para garantir a produção elevada de espermatozoides. Neste processo, células-tronco originam espermatogônias que sofrem proliferação antes de entrarem em meiose (DE ROOIJ, 2001; SCHULZ *et al.*, 2010). O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), proteína não histônica de 36 kDa sintetizada nas fases G1 e S do ciclo celular, é um excelente marcador de proliferação celular, sendo utilizada em estudos cíclicos da espermatogênese de peixes (MIURA *et al.*, 2002; LO NOSTRO *et al.*, 2003; CORRIERO *et al.*, 2007).

Nos testículos de peixes, a apoptose é importante na homeostase tecidual, atuando nas fases espermatogonial e espermiogênica, eliminando células germinativas quando as células de Sertoli não conseguem dar suporte e células germinativas mutantes que interferem na produção espermática (CORRIERO *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2008). A morte celular por apoptose tem sido estudada usando-se diferentes técnicas, tais como a reação de TUNEL *in situ*, associada a características histológicas (TAKLE & ANDERSEN, 2007; DOMINGOS *et al.*, 2012). As células apoptóticas caracterizam-se por perda de junções de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, retração celular, condensação da cromatina na periferia da membrana nuclear e fragmentação celular em corpos apoptóticos, que são geralmente fagocitados por células vizinhas saudáveis, sem que haja reação inflamatória (HSUEH *et al.*, 1994).

A ativação das endonucleases e consequente clivagem do DNA é um passo definitivo em direção à morte celular por apoptose, no entanto há fatores que podem atuar em estágios anteriores e inibir todo o processo apoptótico. Os fatores de sobrevivência celular normalmente atuam ligando-se à superfície celular e ativando vias sinalizadoras que inibem a apoptose. Muitos são os fatores relacionados com a supressão ou ativação da apoptose em células de mamíferos, tais como hormônios, fatores de crescimento e fatores de sobrevivência (HSUEH *et al.*, 1994; ROLAKI *et al.*, 2005).

O sistema IGF regula uma variedade de processos celulares incluindo crescimento, proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação (WOOD *et al.*, 2005). Em vertebrados, IGF1 e IGF2 são sintetizados principalmente no fígado sob influência do hormônio do crescimento (REINECKE, 2010). A expressão do sistema IGF, incluindo peptídeos, receptores e proteínas de ligação, tem sido demonstrada em gônadas de algumas espécies de peixes (PERROT *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2010; RADAELLI *et al.*, 2010), mas o papel na regulação da gametogênese não está totalmente esclarecido. Alguns estudos sugerem que IGF1 esteja envolvido na regulação do crescimento, diferenciação e reprodução por seletivamente promover a mitogênese e diferenciação e inibir a apoptose (KAGAWA *et al.*, 1995; PERROT *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2010; RADAELLI *et al.*, 2010), sendo um regulador local da espermatogênese (REINECKE, 2010).

ESPÉCIE EM ESTUDO

O dourado *Salminus franciscanus* Lima & Britski, 2007 (Characidae: Salmininae), anteriormente denominado *Salminus brasiliensis*, é endêmico da bacia do rio São Francisco, sendo espécie de grande importância na pesca profissional por ser considerado peixe de primeira categoria (LIMA & BRITSKI, 2007). Alcançando cerca de 30 kg de peso corporal, esta espécie tem alto valor comercial e sua carne apresenta excelente sabor. Para muitos, é considerado o peixe mais belo de nossos rios, sendo cobiçado também por pescadores esportivos, pois apresenta grande resistência na pesca por vara e anzol. O dourado necessita realizar longas migrações reprodutivas para desovar (SATO & GODINHO, 2003), sendo uma espécie de reprodução sazonal e de piracema, com reprodução entre novembro e fevereiro, considerada de desova total e ovos livres (RIZZO *et al.*, 2002; BAZZOLI, 2003). Em condições de cultivo, alguns peixes migradores neotropicais, como o dourado, quando mantidos em temperatura acima de 25°C, conseguem responder satisfatoriamente aos procedimentos de reprodução induzida pelo método de hipofiseação heteroplástico, no qual extrato bruto de hipófise de carpa é injetado dentro da cavidade celômica ou por via intramuscular (ARANTES *et al.*, 2011b).

Em função da degradação ambiental, *S. franciscanus* desapareceu em algumas regiões da bacia do rio São Francisco, como a jusante da barragem de Sobradinho. Embora exista um grande interesse no cultivo do dourado, principalmente em sistemas semi-intensivos e pesque-pagues, as tecnologias para sua produção são ainda incipientes (SATO, 1999). Comparando-se a espécie mais estudada, *S. maxillosus*, atualmente conhecida como *S. brasiliensis* (Cuvier, 1816) que ocorre em toda a bacia do rio da Prata, poucas informações foram publicadas sobre a biologia e ecologia do dourado *S. franciscanus*. Dentre os trabalhos realizados, incluem-se a ontogênese larval (SANTOS & GODINHO, 2002), reprodução induzida (SATO *et al.*, 2003), fecundidade (ARANTES, 2004), anatomia do sistema digestório (RODRIGUES & MENIN, 2008) e citogenética molecular (SOUZA *et al.*, 2008).

Embora alguns parâmetros reprodutivos de *S. franciscanus* tenham sido estudados previamente (ISAAC-JÚNIOR, 1999), pretende-se, com o presente trabalho, adicionar novas informações sobre a biologia reprodutiva desta importante espécie de peixe da bacia do rio São Francisco, visando à implementação de programas de conservação de suas populações e como suporte para o desenvolvimento de tecnologias de cultivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Analisar a gametogênese, atividade reprodutiva e fecundidade do dourado *S. franciscanus* no rio São Francisco, a jusante da barragem de Três Marias, Minas Gerais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os principais indicadores reprodutivos e fisiológicos: CT, PC, IGS e K, relacionando-os com os parâmetros físico-químicos da água;
- Determinar a frequência dos estádios de maturação gonadal de machos e fêmeas;
- Analisar as principais características morfológicas da gametogênese da espécie através de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão;
- Determinar as características da superfície ovocitária após a desova através de microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a fecundidade em fêmeas submetidas à desova induzida;
- Detectar através de imuno-histoquímica a localização de PCNA e IGF1 em testículos;
- Detectar células em apoptose em testículos através da reação de TUNEL *in situ*.

MATERIAIS E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo (**Figura 1**) compreendeu trecho com cerca de 54 Km localizado entre a barragem de Três Marias (18°11'S, 45°14'W) e a foz do rio de Janeiro (17°55'S, 45°06'W) na região do alto rio São Francisco. Nesta região, localiza-se a usina hidrelétrica de Três Marias, implantada em 1960 com objetivos principais de geração de energia elétrica para a região sudeste do Brasil e controle de cheias do rio São Francisco. Cerca de 30 Km a jusante da barragem de Três Marias, o rio São Francisco recebe águas do rio Abaeté (18°11'S, 45°14'W), um tributário de porte médio considerado importante para migração e desova de peixes de piracema (SATO *et al.*, 2005).

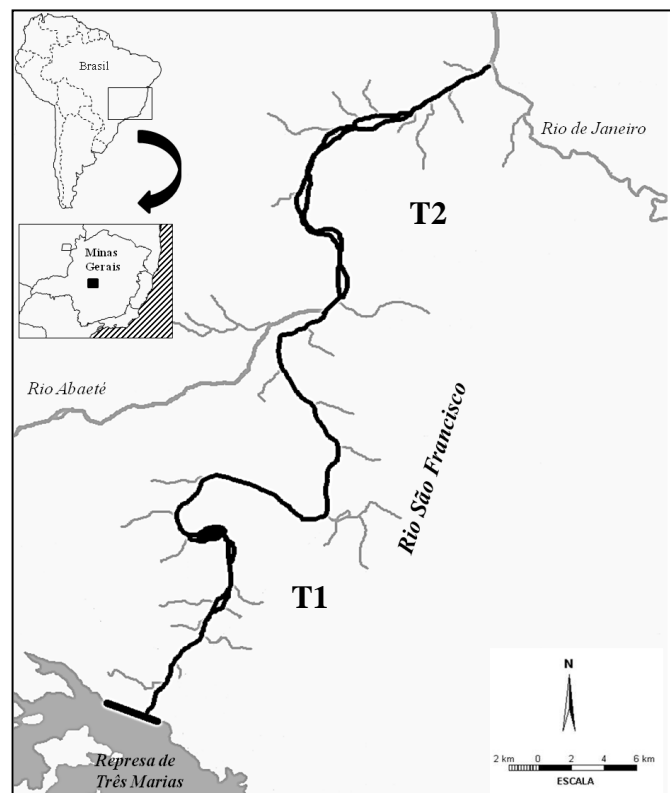


Figura 1: Mapa de localização da área de estudo no alto rio São Francisco, estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. A área marcada em preto no mapa de Minas Gerais indica a localização da área de amostragem, em dois trechos do rio: logo a jusante da barragem de Três Marias (T1) e a jusante da desembocadura do rio Abaeté (T2).

AMOSTRAGENS DOS PEIXES

Um total de 67 fêmeas e 216 machos do dourado *S. franciscanus* foram capturados mensalmente durante um ciclo reprodutivo de agosto de 2009 a julho de 2010, pela equipe de pesca da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, utilizando diferentes petrechos de pesca, tais como redes de emalhar e tarrafa. No local de coleta, os peixes foram dissecados e manipulados para obtenção de comprimento total (CT), peso corporal (PC) e peso das gônadas (PG). Os dados biométricos foram utilizados para calcular os seguintes indicadores biológicos de cada exemplar: índice gonadossomático ($IGS = 100 \times PG/PC$) e fator de condição de Fulton ($K = 100 \times PC/CT^3$). Todos os procedimentos seguiram os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

A relação peso-comprimento foi calculada para fêmeas e para machos utilizando-se a equação $PC = aCT^b$, onde a é o intercepto e b , a inclinação da linha de regressão. Os parâmetros a e b foram estimados através de regressão linear, e o grau de associação entre as variáveis PC e CT foi avaliada utilizando-se o coeficiente de correlação R^2 .

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Os principais parâmetros físico-químicos da água, tais como temperatura, pH, condutividade elétrica a 25°C e oxigênio dissolvido, foram obtidos a jusante do rio Abaeté, utilizando-se sonda Horiba modelo U-10. As medidas foram realizadas durante a amostragem dos peixes em agosto, novembro e fevereiro de 2009 e maio de 2010. A transparência da água foi avaliada através da profundidade do disco de Secchi.

HISTOLOGIA E MORFOMETRIA

No local de coleta, amostras da região média das gônadas foram obtidas de cada peixe e fixadas em líquido de Bouin por 8 horas para análise histológica da maturação gonadal. No laboratório, as amostras foram submetidas a técnicas histológicas com inclusão em parafina, microtomia com 4-5µm de espessura e coloração com hematoxilina-eosina. Os estádios de

maturação gonadal foram estabelecidos para fêmeas e para machos baseando-se na distribuição das células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (ARANTES *et al.*, 2010). O período reprodutivo e tipo de desova da espécie foram determinados pela distribuição das frequências dos estádios de maturação gonadal e pelas características histológicas dos ovários no período reprodutivo (BAZZOLI, 2003). O diâmetro dos folículos ovarianos foi determinado em cortes histológicos, sendo medidos 100 folículos em cada fase de desenvolvimento com ampliação de 100 ou 400x. A espessura da zona radiata, altura da célula folicular, diâmetros externo e interno da micrópila e altura da célula micropilar foram medidos em 10-20 folículos vitelogênicos, com ampliação de 1000x.

As células espermatozóides foram identificadas (SCHULZ *et al.*, 2010) e o diâmetro nuclear foi obtido em secções histológicas de testículos medindo-se 100 células em cada fase de desenvolvimento, com ampliação de 1000x. O diâmetro dos túbulos seminíferos foi determinado em cada estágio de maturação gonadal, medindo-se 100 túbulos com ampliação de 100x ou 400x.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para análise ultraestrutural, amostras de testículos e ovários foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%) em tampão fosfato pH 7,3 por 24 horas a 4°C. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% reduzido com ferrocianeto de potássio 1,5%, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por 2 horas à temperatura ambiente, desidratadas em etanol, infiltradas e incluídas em resina Epon. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados ao microscópio eletrônico de transmissão.

Para análise das características ultraestruturais da superfície ovocitária, fêmeas do dourado foram submetidas à desova induzida por hipofiseção de acordo com metodologia de rotina na Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (SATO *et al.*, 1996, 1997). Amostras de ovócitos ovulados foram fixadas em solução Karnovsky, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas em duas etapas, intercaladas com ácido tânico 1% durante 20 minutos. Após desidratação, os espécimes foram secos em ponto crítico com CO₂, montados em suportes, metalizados com ouro durante 1-2 minutos a 15 mV e examinados ao microscópio eletrônico de varredura.

FECUNDIDADE

Para determinação da fecundidade de *S. franciscanus*, amostras de ovócitos desovados foram coletadas de 12 fêmeas submetidas à desova induzida, conforme indicado acima. As amostras (1-2 g) foram pesadas, e a contagem dos ovócitos foi realizada manualmente sob estereomicroscópio. A fecundidade absoluta ($FA = NOG \times PO$) e a fecundidade relativa ($FR = FA/CT$ e $FR = FA/PC$) foram estimadas considerando-se: (NOG) número de ovócitos por grama de ovócitos, (PO) peso total dos ovócitos desovados (ARANTES *et al.*, 2011b).

REAÇÃO DE TUNEL *IN SITU*

Para detecção de células apoptóticas, amostras de testículos em maturação e maduros foram fixadas em líquido de Bouin ou em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3, incluídas em parafina, seccionadas com 4 μ m de espessura e submetidas à técnica de TUNEL *in situ* (kit QIA 33 TdT-FragEL DNA fragmentation, Calbiochem), seguindo-se o protocolo do fabricante. Para 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 da enzima *terminal deoxynucleotides transferase* (TdT) e deoxinucleotídeos conjugados com biotina em câmara úmida a 37 °C por 90 minutos. Em seguida, foi aplicada solução de estreptavidina conjugada com peroxidase em câmara úmida à temperatura ambiente por 45 minutos. A reação de peroxidase foi revelada com diaminobenzidina (DAB), e as secções foram contracoradas com hematoxilina. Para controle-negativo, uma das lâminas não recebeu a mistura contendo a enzima TdT e deoxinucleotídeos.

IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para a imunolocalização de PCNA (anticorpo anti-PCNA monoclonal de camundongo, clone PC-10, Santa Cruz Biotechnology) e IGF1 (anticorpo anti-IGF1 policlonal de camundongo, Santa Cruz Biotechnology), foram utilizadas secções transversais das mesmas amostras utilizadas para a reação de TUNEL, fixadas em Bouin ou paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3. Para reativação antigênica, foi utilizado um pré-tratamento com

tampão ácido cítrico pH 6,0 a 95°C por 30 minutos. Após lavagem com TBS, para bloqueio de reações inespecíficas e da peroxidase endógena, foram utilizados BSA 2% e água oxigenada 3%, respectivamente. As secções histológicas foram incubadas com anticorpo primário *overnight* a 4°C, na diluição de 1:100 para PCNA e 1:50 para IGF1. O sistema de revelação secundário utilizado foi o kit da Dakocytomation LSAB (anticorpo secundário de cabra conjugado com biotina e estreptavidina conjugada com peroxidase), seguindo-se o protocolo do fabricante. As marcações foram visualizadas com DAB e contracoradas com hematoxilina. Para controle-negativo, uma das lâminas não recebeu o anticorpo primário.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os programas Microsoft Excel e GraphPad InStat foram utilizados na confecção de tabelas e gráficos. Os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão (parâmetros abióticos) ou média \pm erro padrão (parâmetros bióticos).

Após teste de normalidade, os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparar IGS, K e os parâmetros bióticos por bimestre e por estágio de maturação gonadal. Teste T de Student não pareado foi usado para comparar CT e PC por sexo, além de parâmetros bióticos por trecho.

A relação peso-comprimento foi avaliada pela análise de regressão linear através do software BioEstat. O Teste T de Student foi aplicado para testar se os valores de b foram significativamente diferentes de 3,0, indicando o tipo de crescimento: isométrico ($b = 3,0$), alométrico positivo ($b > 3,0$) ou alométrico negativo ($b < 3,0$) (SPIEGEL, 1991).

Regressão linear foi também usada para analisar a associação entre fecundidade absoluta e CT, PC e PO.

RESULTADOS

PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DOS PEIXES

Fêmeas de *S. franciscanus* foram significativamente maiores do que machos, e os maiores peixes foram coletados após a confluência com o rio Abaeté (**Tabela 1**). Em todas as coletas, houve predominância acentuada de machos sobre as fêmeas e a proporção sexual na amostragem total foi 3 machos: 1 fêmea. A relação peso-comprimento mostrou crescimento alométrico positivo, com coeficiente de regressão linear maior que 3 para fêmeas e crescimento isométrico, com coeficiente de regressão linear próximo a 3 para machos (**Figura 2**). Os valores de R^2 mostraram alta correlação entre CT e PC para fêmeas ($R^2 = 99,58$) e para machos ($R^2 = 98,64$).

Tabela 1: Dados biométricos e índices biológicos de fêmeas e machos de dourado *S. franciscanus* em dois trechos do alto rio São Francisco, logo a jusante da barragem de Três Marias (T1) e a jusante da desembocadura do rio Abaeté (T2).

	Fêmeas (n = 67)		Machos (n = 216)	
	T1 (n = 18)	T2 (n = 49)	T1 (n = 106)	T2 (n = 110)
CT (cm)	34,61 ± 3,90 ^a	55,06 ± 3,55 ^b	28,51 ± 0,90 ^a	37,05 ± 1,55 ^b
PC (kg)	0,83 ± 0,35 ^a	3,20 ± 0,42 ^b	0,31 ± 0,05 ^a	0,90 ± 0,13 ^b
IGS	0,13 ± 0,04 ^a	1,91 ± 0,39 ^b	0,25 ± 0,06 ^a	0,63 ± 0,07 ^b
K	0,98 ± 0,03 ^a	1,11 ± 0,02 ^b	0,97 ± 0,01 ^a	0,99 ± 0,01 ^a

(CT) comprimento total, (PC) peso corporal, (IGS) índice gonadosomático, (K) fator de condição de Fulton. Os valores representam média ± erro padrão. Para cada sexo, na mesma linha, diferentes letras indicam diferenças significativas entre os trechos de amostragem, com $p < 0,05$, Teste T não pareado.

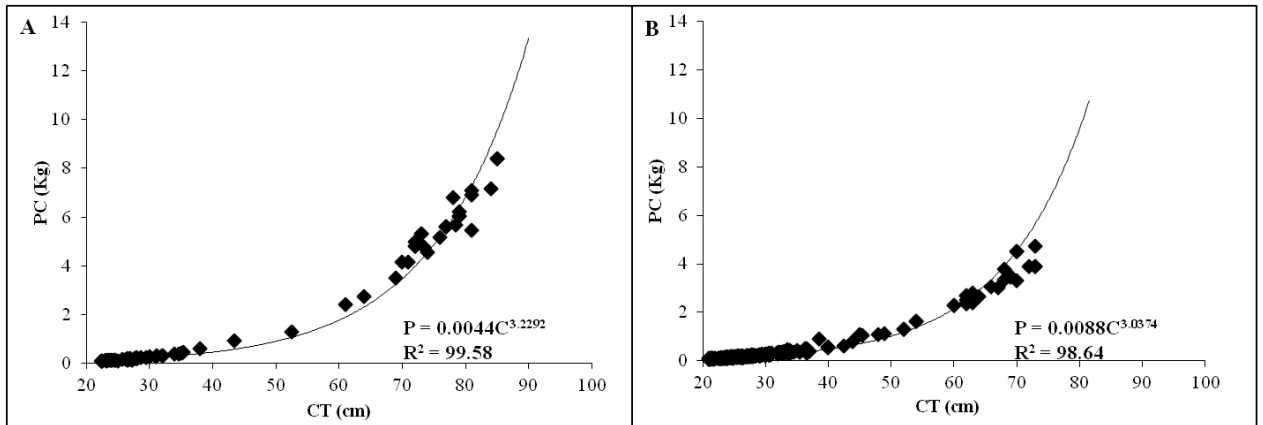


Figura 2: Relação peso corporal/comprimento total para fêmeas (A) e machos (B) de *S. franciscanus* no alto rio São Francisco; peixes capturados em trecho com 54 Km a jusante da usina hidrelétrica de Três Marias, Minas Gerais, no período de agosto de 2009 a julho de 2010.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

A temperatura da água variou de 22 a 27 °C, sendo mais elevada em fevereiro e maio (Tabela 2). O oxigênio dissolvido foi superior a 6 mg/L em todos os períodos amostrados. O pH e a condutividade elétrica apresentaram poucas variações nos períodos amostrados. A transparência da água foi significativamente menor em fevereiro e maio.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos da água do alto rio São Francisco, região de confluência com o rio Abaeté, Minas Gerais, Brasil.

	Agosto/09	Novembro/09	Fevereiro/10	Mai/10
Temperatura (°C)	22,76 ± 0,11 ^a	24,09 ± 0,67 ^b	26,4 ± 0,21 ^c	25,85 ± 0,51 ^c
OD (mg/L)	7,93 ± 0,35 ^a	6,24 ± 1,42 ^b	7,67 ± 0,13 ^{ab}	7,25 ± 0,45 ^{ab}
pH	6,51 ± 0,19 ^a	6,07 ± 0,37 ^b	6,16 ± 0,10 ^{ab}	6,13 ± 0,19 ^{ab}
Cdt (µS/cm)	78,00 ± 3,46 ^a	77,00 ± 3,20 ^a	75,17 ± 15,82 ^a	72,11 ± 10,71 ^a
Secchi (m)	3,36 ± 0,18 ^a	3,35 ± 0,30 ^a	1,58 ± 0,13 ^b	1,98 ± 0,68 ^b

Os valores representam média ± desvio padrão de 5 a 8 medidas. Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas entre os períodos de coleta, com $p < 0,05$. OD, oxigênio dissolvido; Cdt, condutividade elétrica a 25°C; Secchi, profundidade do disco de Secchi.

FOLICULOGÊNESE, ULTRAESTRUTURA DE OVÓCITOS E FECUNDIDADE

O diâmetro dos folículos ovarianos (média \pm erro padrão) de *S. franciscanus* aumentou nas diferentes fases de desenvolvimento, acompanhando as variações da maturação ovariana (**Figura 4**): folículo perinucleolar inicial ($71,88 \pm 1,58 \mu\text{m}$) e avançado ($148,50 \pm 2,06 \mu\text{m}$) com vários nucléolos, folículo pré-vitelogênico ($378,90 \pm 7,40 \mu\text{m}$) com vesículas corticais e folículo vitelogênico ($751,00 \pm 6,79 \mu\text{m}$) com acúmulo de glóbulos de vitelo no ooplasma. Durante a vitelogênese, ovócitos foram envolvidos por espessa zona radiata ($7,3 \pm 1,4 \mu\text{m}$ de espessura) com camadas interna e externa, células foliculares pavimentosas ($4,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$ de espessura) apoiadas em membrana basal e fina teca de tecido conjuntivo mais externamente. Nessa fase, observou-se a micrópila em forma de funil (diâmetros externo = $21,4 \pm 3,4 \mu\text{m}$ e interno = $2,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$) ocluída por uma célula micropilar (altura = $29,0 \pm 4,4 \mu\text{m}$). Após a desova, os ovários apresentaram folículos pós-ovulatórios e folículos atrésicos em diferentes fases de involução.

Ao microscópio eletrônico de transmissão, observaram-se folículos perinucleolares com mitocôndrias e polissomos livres abundantes no ooplasma envolvidos por células foliculares baixas apoiadas em espessa membrana basal (**Figura 5**). Nos folículos pré-vitelogênicos, observaram-se vesículas corticais claras armazenando material finamente granular. Nos folículos vitelogênicos, a zona radiata mostrou camada interna espessa com finos poros-canais transversais, camada média fina e mais elétron-densa, e camada externa pouco elétron-densa voltada para as células foliculares.

Ao microscópio eletrônico de varredura, ovócitos desovados de *S. franciscanus* apresentaram finos poros-canais distribuídos regularmente na superfície ovocitária no polo vegetativo. No polo animal, a superfície ovocitária mostrou arranjo de poros-canais circundando a micrópila, com pregas na superfície do vestíbulo e fino canal micropilar internamente (**Figura 6**).

A fecundidade absoluta de fêmeas submetidas à desova induzida variou de 167.048 a 440.320 ovos liberados por fêmea, e a fecundidade relativa de 3.341 a 7.102 ovos/cm (CT) e de 129 a 175 ovos/g (PC) (**Tabela 3**). A análise de regressão linear mostrou uma associação geométrica entre FA x PO ($R^2 = 95,81$) e FA x PC ($R^2 = 86,14$) e associação logarítmica entre FA x CT ($R^2 = 66,54$).

Tabela 3: Fecundidade absoluta (FA) e fecundidade relativa (FR) ao peso corporal (FR/PC) e ao comprimento total (FR/CT) de fêmeas de *S. franciscanus* submetidas à desova induzida por hipofiseção.

N	CT (cm)	PC (g)	PO (g)	NOG	FA	FR/PC	FR/CT
1	56	2125	234	1205	281970	132,7	5035,179
2	62	2920	344	1280	440320	150,8	7101,935
3	59	2300	272	1184	322048	140,0	5458,441
4	55	2090	247	1291	318877	152,6	5797,764
5	54	1850	202	1328	268256	145,0	4967,704
6	51	1330	154	1112	171248	128,8	3357,804
7	50	1250	152	1099	167048	133,6	3340,96
8	61	2540	278	1209	336102	132,3	5509,869
9	55	2082	260	1153	299780	144,0	5450,545
10	53	1792	231	1285	296835	165,6	5600,66
11	53	1776	238	1303	310114	174,6	5851,208
12	54	2025	263	1312	345056	170,4	6389,926
Média	55,25	2006,67	239,58	1230,08	296471,17	147,54	5321,83
DP	3,72	465,72	53,06	80,40	73493,70	15,65	1085,17

(CT) comprimento total, (PC) peso corporal, (PO) peso total dos ovócitos liberados, (NOG) número de ovócitos por grama, (DP) desvio padrão.

ESPERMATOGÊNESE E ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS

O diâmetro do núcleo das células espermatozógenicas (média \pm erro padrão) reduziu progressivamente nas diferentes fases de desenvolvimento: espermatozógenia tipo A indiferenciada ($7,85 \pm 0,07 \mu\text{m}$), espermatozógenia tipo A diferenciada ($5,93 \pm 0,04 \mu\text{m}$), espermatozógenia tipo B ($4,69 \pm 0,07 \mu\text{m}$), espermatozócio primário ($4,56 \pm 0,05 \mu\text{m}$), espermatozócio secundário ($2,90 \pm 0,04 \mu\text{m}$), espermátide ($2,34 \pm 0,05 \mu\text{m}$) e espermatozóide ($1,56 \pm 0,05 \mu\text{m}$). Em peixes maduros, os espermatozóides estavam mergulhados em secreção acidófila no lume dos túbulos seminíferos. O diâmetro dos túbulos seminíferos (média \pm erro padrão) aumentou significativamente com a maturação testicular (**Figura 7**): repouso ($35,34 \pm 1,56 \mu\text{m}$), maturação ($225,31 \pm 10,76 \mu\text{m}$), espermição ($270,40 \pm 6,48 \mu\text{m}$) e pós-espermição ($65,12 \pm 2,77 \mu\text{m}$).

A ultraestrutura das células espermatozógenicas mostrou espermatozógenias tipo A isoladas e tipo B em cistos com citoplasma rico em mitocôndrias, núcleo com cromatina finamente granular e nucléolo evidente (**Figura 8**). Os espermatozócios apresentaram citoplasma elétron-lúcido, com cromatina parcialmente condensada de aspecto variável de

acordo com a fase de desenvolvimento da meiose. As espermatídes apresentaram citoplasma bastante reduzido, cromatina em diferentes graus de condensação, formação da peça intermediária, flagelo com várias camadas de membranas concêntricas e axonema com esqueleto microtubular no padrão 9 + 2. Os espermatozoides apresentaram cabeça arredondada com cromatina no grau máximo de condensação formando grumos altamente elétron-densos, peça intermediária curta e flagelo alongado, e estavam mergulhados na secreção tubular elétron-densa.

MATURAÇÃO GONADAL E ATIVIDADE REPRODUTIVA

Baseando-se em características microscópicas das gônadas, os seguintes estádios de maturação gonadal foram determinados para fêmeas e para machos: (1) repouso, (2) maturação, (3) desova/espermição e (4) pós-desova/pós-espermição (**Figuras 4 e 7**). Considerando-se a amostragem total, 57% das fêmeas estavam em repouso (estádio 1), 18% em maturação (estádio 2), 13% em desova (estádio 3) e 12% pós-desova (estádio 4). Dentre os machos, capturaram-se 46% de peixes em repouso, 34% em maturação, 6% em espermição e 14% pós-espermição.

Quanto às frequências dos estádios de maturação gonadal por bimestre, peixes em repouso foram observados em todas as amostragens (**Figura 3, Tabela 4**). Fêmeas em maturação (estádio 2) e em desova (estádio 3) foram predominantes nos bimestres outubro/novembro e dezembro/janeiro e foram capturadas predominantemente (95%) após a confluência do rio Abaeté e no próprio rio Abaeté (T2). Nos machos, os estádios de maturação e espermição iniciaram-se no bimestre agosto/setembro estendendo-se até fevereiro/março, representando 62% em T2. O estágio pós-desova/pós-espermição (estádio 4) ocorreu de dezembro/janeiro até abril/maio nas fêmeas e até junho/julho nos machos, representando mais de 60% em T2.

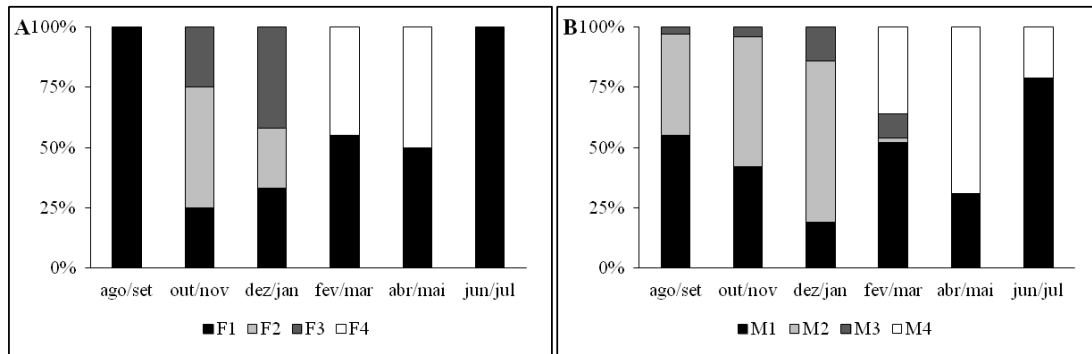


Figura 3: Frequências relativas dos estádios de maturação gonadal por bimestre de fêmeas (A) e machos (B) de *S. franciscanus* no alto rio São Francisco; peixes capturados em trecho com 54 Km a jusante da usina hidrelétrica de Três Marias, Minas Gerais, no período de agosto de 2009 a julho de 2010.

Tabela 4: Frequências dos estádios de maturação gonadal de *S. franciscanus* no alto rio São Francisco, regiões antes (T1) e após (T2) a confluência do rio Abaeté.

	Fêmeas (n = 67)			Machos (n = 216)		
	T1	T2	Total	T1	T2	Total
1	14 (37%)	24 (63%)	38	63 (63%)	37 (37%)	100
2	1 (8%)	11 (92%)	12	31 (42%)	42 (58%)	73
3	0 (0%)	9 (100%)	9	2 (15%)	11 (85%)	13
4	3 (37%)	5 (63%)	8	10 (33%)	20 (67%)	30
Total	18	49	67	106	110	216

(1) repouso, (2) maturação, (3) desova/espermiação e (4) pós-desova/pós-espermiação.

RELAÇÃO ENTRE IGS E K

O IGS acompanhou as variações morfológicas da maturação gonadal (Figura 9), atingindo 7,08 nas fêmeas e 3,46 nos machos. O pico do IGS ocorreu em outubro/novembro (estádio 2, maturação) e valores mais baixos ocorreram durante o repouso gonadal (estádio 1) que predominou nos bimestres junho/julho e agosto/setembro (Figura 10). Os valores de K

foram mais elevados nos estádios 2 e 3, reduzindo significativamente no estágio 4, pós-desova/pós-espermição (fevereiro/março), com diferenças mais evidentes nas fêmeas.

REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS E TUNEL

As imunomarcações de PCNA foram observadas no núcleo de células germinativas e somáticas e foram evidentes nas fases espermatogonial e espermatocitária (**Figura 11. A-D**). Células de Leydig e células de Sertoli foram também marcadas. A reação PCNA-positiva foi observada em todos os estádios de maturação gonadal, sendo mais evidente durante a maturação testicular. As espermatídes e espermatozoides não foram marcados por PCNA.

A reação de TUNEL *in situ* foi observada no núcleo de espermatogônias (**Figura 11. E-F**), tanto indiferenciadas quanto diferenciadas, e espermatócitos (**Figura 11. G-H**), principalmente primários, em todos os estádios de maturação testicular. Espermatídes TUNEL-positivas foram raramente observadas.

As imunomarcações de IGF1 foram observadas no citoplasma das células germinativas e somáticas. A reação imuno-histoquímica foi observada principalmente nas células de Sertoli envolvendo os cistos espermatogênicos (**Figura 11. J-K**). Células peritubulares mioides e células de Leydig, bem como cistos de espermatogônias e espermatócitos (**Figura 11. I, L**) foram também marcadas por IGF1. Não foram observadas marcações para IGF1 nos espermatozoides.

Figura 4: Secções histológicas de ovários de *S. franciscanus* em diferentes estádios de maturação coradas com hematoxilina e eosina. **(A)** estágio 1, repouso, lamelas ovulíferas com ninhos de ovogônias e folículos perinucleolares (PN) inicial e avançado; **(B-C)** estágio 2, maturação inicial com folículos pré-vitelogênicos (PV) com vesículas corticais (VC); **(D)** e maturação avançada com folículos vitelogênicos (V) com glóbulos de vitelo no ooplasma e núcleo (N) central ou excêntrico; **(E)** estágio 3, desova, folículos pós-ovulatórios (FPO) evidentes e folículos vitelogênicos; **(F)** Detalhe da região micropilar (seta), mostrando os envoltórios foliculares na fase vitelogênica, com zona radiata espessa (ZR), células foliculares (CF) pavimentosas e fina teca (T) conjuntiva; **(G)** Detalhe do folículo pós-ovulatório (FPO); **(H)** estágio 4, pós-desova, folículos atrésicos (FA) em regressão e folículos vitelogênicos (V) residuais; **(I)** detalhe do folículo atrésico com células foliculares hipertrofiadas, zona radiata fragmentada e teca espessa. Barra: 200 µm (A, D, H e E), 100 µm (G e B), 25 µm (C, F e I).

Figura 5: Ultraestrutura dos folículos ovarianos de *S. franciscanus*. **(A-C)** folículo perinucleolar mostrando células foliculares (CF) apoiadas em membrana basal (MB) espessada, região de contato entre prolongamentos do ovócito (Ov) e das células foliculares (CF) e início de deposição de material elétron-denso (seta) da zona radiata (A), junção de adesão, desmossomos (B) unindo célula folicular e ovócito e numerosas mitocôndrias (M) e polissomas livres no ooplasma (C); **(D)** Detalhe das vesículas corticais (VC) elétron-lúcidas, com material filamentososo (seta) em seu interior em folículos pré-vitelogênicos; **(E)** Folículo vitelogênico, mostrando as três camadas da zona radiata totalmente desenvolvida: interna (I) com poros-canais transversais, média (M) e externa (E) voltada para as células foliculares (CF). Barra: 2 μm (A, D e E), 1 μm (B-C), 0,05 μm (detalhe em B).

Figura 6: Superfície de ovócitos ovulados de *S. franciscanus* ao microscópio eletrônico de varredura. **(A)** Região do polo animal, onde se localiza a micrópila; **(B)** Detalhe da micrópila em forma de funil, com vestíbulo com pregas na superfície e canal micropilar; **(C-D)** Diferente organização dos poros-canais da zona radiata no polo animal (C) e no polo vegetativo (D). Barra: 10 μm (A-B), 5 μm (C-D).

Figura 7: Secções histológicas de testículos de *S. franciscanus* coradas com hematoxilina e eosina. **(A)** Espermatogônia tipo A indiferenciada; **(B)** Espermatogônias tipo A pareadas; **(C)** Cisto de espermatogônias tipo B; **(D)** Cisto de espermatócitos primários; **(E)** Cisto de espermatócitos secundários; **(F)** Cisto de espermátides; **(G)** Espermatozoides; **(H)** estágio 1, repouso, túbulo seminíferos fechados com espermatogônias (G); **(I)** estágio 2, maturação, cistos de células espermatogênicas em diferentes fases de desenvolvimento: espermatogônias (G), espermatócitos primários (C1) e secundários (C2), espermátides (E) e poucos espermatozoides (Z) no lume tubular; **(J)** estágio 3, espermição, espermatozoides (Z) e secreção acidófila (*) no lume tubular; **(K)** estágio 4, pós-espermição, túbulos seminíferos com espermatogônias (G) e lumes vazios (*) ou com espermatozoides residuais (Z). Barra: 5 µm (A, B, C), 10 µm (D, E, F e G), 50 µm (H, I, J e K).

Figura 8: Ultraestrutura das células espermatogênicas de *S. franciscanus*. **(A)** Espermatogônia tipo A indiferenciada; **(B)** Espermatogônia tipo B (G) e espermatócitos (C1); **(C)** Cisto de espermátides (E) em diferenciação com formação da peça intermediária e do flagelo e célula em degeneração (*); **(D-E)** Detalhe de espermátide mostrando compactação da cromatina, peça intermediária e flagelo com 9 + 2 arranjo de microtúbulos envolvidos por camadas de membranas concêntricas; **(F)** Numerosos espermatozoides (Z) e cortes transversais de flagelos (seta) embebidos na secreção tubular (*). Barra: 2 μm (A, B, C e F), 1 μm (D), 0,05 μm (E).

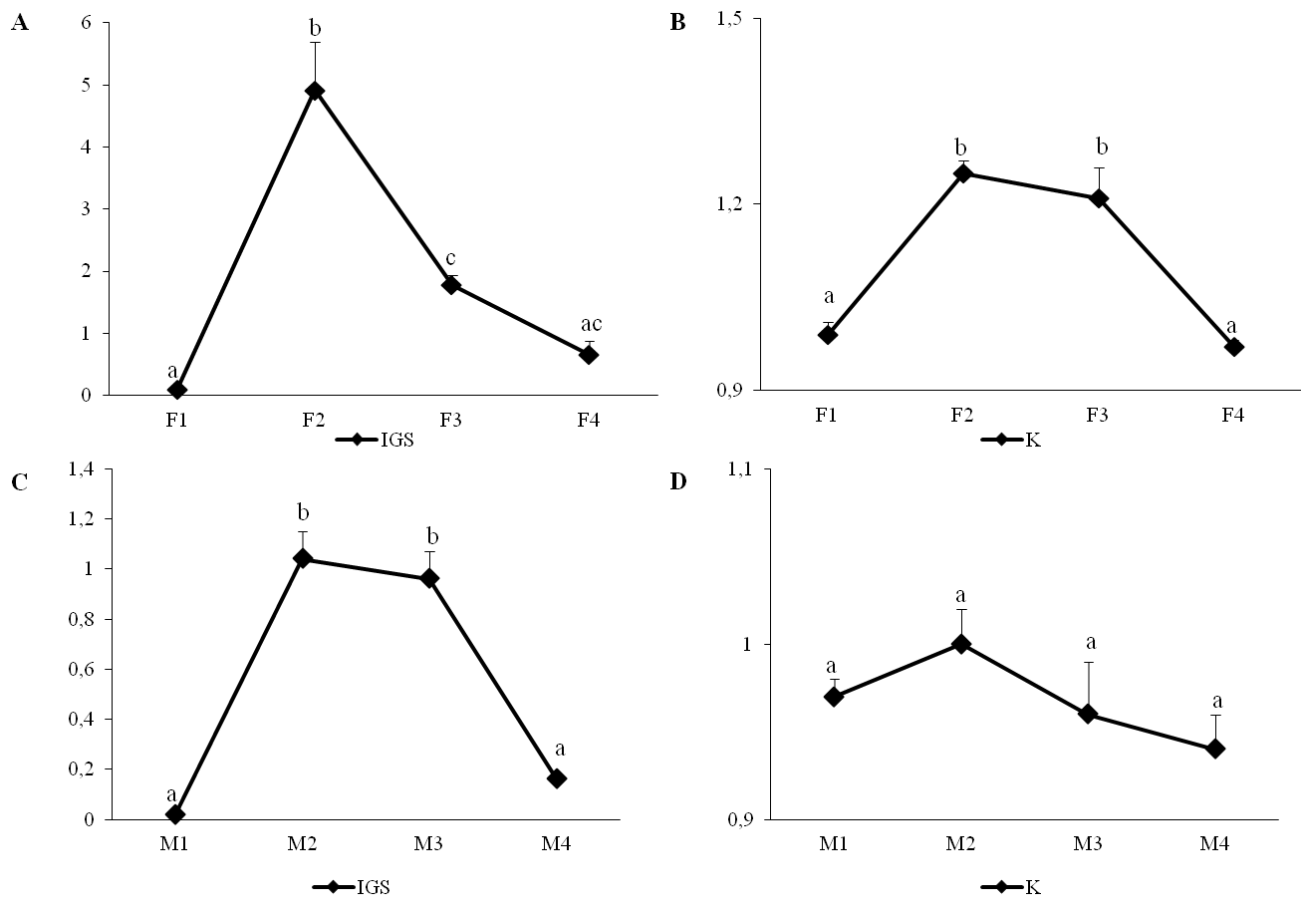


Figura 9: Índice gonadosomático (IGS) e fator de condição de Fulton (K) por estágio de maturação gonadal para fêmeas (A-B) e machos (C-D) de *S. franciscanus* no alto rio São Francisco; peixes capturados em trecho com 54 Km a jusante da usina hidrelétrica de Três Marias, Minas Gerais, no período de agosto de 2009 a julho de 2010. Os valores representam média \pm erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os estádios de maturação gonadal, com $p < 0,05$.

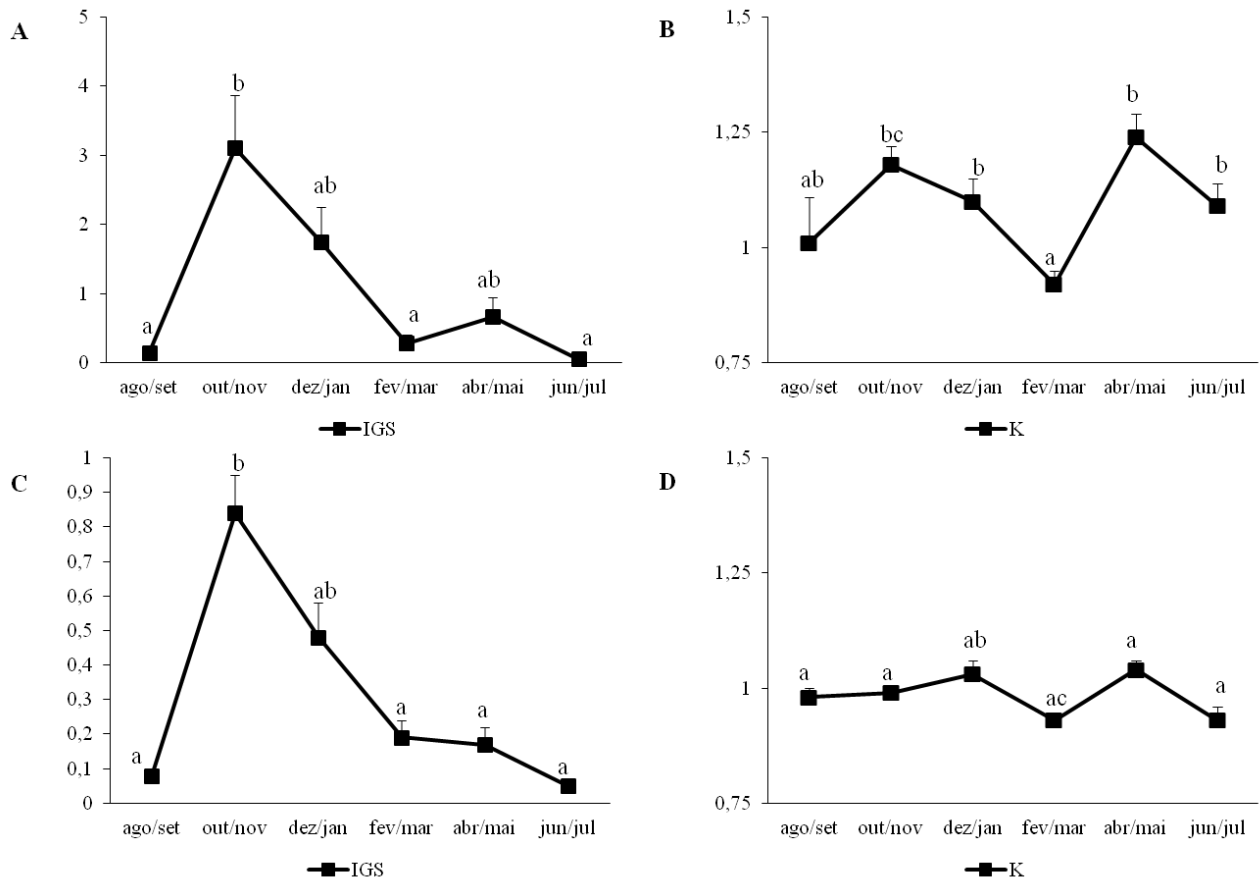


Figura 10: Índice gonadosomático (IGS) e fator de condição de Fulton (K) por bimestre para fêmeas (A-B) e machos (C-D) de *S. franciscanus* no alto rio São Francisco; peixes capturados em trecho com 54 Km a jusante da usina hidrelétrica de Três Marias, Minas Gerais, no período de agosto de 2009 a julho de 2010. Os valores representam média \pm erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os bimestres de amostragem, com $p < 0,05$.

Figura 11: Reações imuno-histoquímicas para PCNA (A-D), TUNEL (E-H) e imuno-histoquímica para IGF1 (I-L), reveladas com peroxidase durante as fases de desenvolvimento testicular de *S. franciscanus* no alto rio São Francisco. Contracoloração com hematoxilina. (A) Espermatogônia isolada; (B) Espermatogônias tipo B; (C) Cistos contendo espermatogônias e espermatócitos primários; (D) Espermatócitos; (E) Espermatogônias e espermatócitos TUNEL-positivos; (F) Espermatogônia isolada; (G) Espermatócito primário; (H) Espermatócitos; (I) Citoplasma marcado de espermatogônia isolada; (J) Células de Sertoli marcadas envolvendo cistos de espermatócitos; (K, L) Espermatócitos primários. Barras = 10 μ m (A, B, C, F, H, K e L); Barras = 20 μ m (D, G, I e J); Barra = 70 μ m (E).

DISCUSSÃO

Apesar da importância ecológica e comercial do dourado *S. franciscanus* e dos impactos que afetam sua reprodução no rio São Francisco, poucos estudos foram realizados para compreensão de sua biologia, incluindo reprodução induzida (SATO *et al.*, 1997; SATO *et al.*, 2003), ontogênese larval (SANTOS & GODINHO, 2002), citogenética molecular (SOUZA *et al.*, 2008), sendo que nenhum estudo sobre sua reprodução foi realizado em ambiente natural. No presente trabalho, análises da gametogênese, maturação gonadal, desova e fecundidade demonstram que, apesar do barramento do rio, o dourado encontrou condições favoráveis para reprodução e desova na região do alto rio São Francisco. Estudos prévios realizados a jusante da barragem de Três Marias evidenciaram o papel do rio Abaeté no sucesso reprodutivo da espécie migradora curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* (ARANTES *et al.*, 2010; DOMINGOS *et al.*, 2012). Similar ao presente estudo, os autores observaram que, no trecho localizado logo após a barragem, a maioria dos peixes capturados encontrava-se em repouso enquanto peixes em maturação e desova foram encontrados após a foz do rio Abaeté. Juntos, os anteriores e o presente estudo corroboram a importância de tributários para conservação das populações de peixes nativos de importância comercial como o dourado *S. franciscanus* no rio São Francisco.

PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DOS PEIXES E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

No presente estudo, as fêmeas de *S. franciscanus* foram maiores e mais pesadas do que os machos, fato semelhante a outras espécies de importância comercial da bacia do rio São Francisco, tais como o surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (BRITO & BAZZOLI, 2003) e matrinxã *Brycon orthotaenia* (GONÇALVES *et al.*, 2006). A proporção sexual detectada neste estudo foi de 3 machos para 1 fêmea, como também reportado para o surubim. Em contraste, uma proporção de 1 macho para 3 fêmeas foi observada na matrinxã, ambos capturados no alto rio São Francisco, região de Pirapora, Minas Gerais (BRITO & BAZZOLI, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2006). Essas diferenças da proporção sexual esperada (1:1) podem estar relacionadas à captura de espécimes maiores na pesca comercial e à seletividade de petrechos de pesca, assim como fatores fisiológicos e ambientais que afetam diferentemente os sexos (VAZZOLER, 1996). A relação peso-comprimento indicou crescimento alométrico positivo para fêmeas de *S. franciscanus*, similar a outras espécies

como o rubio *Salminus affinis* no Rio Sinú, Colômbia (OLAYA-NIETO *et al.*, 2008), refletindo o alto investimento energético das fêmeas na reprodução, com ganho de peso mais rápido do que o aumento corporal em comprimento. Por outro lado, crescimento isométrico indica que os machos de *S. franciscanus* investem menos na reprodução do que as fêmeas e exibem proporções corporais que variam pouco durante o crescimento, similar aos machos de *S. affinis* (OLAYA-NIETO *et al.*, 2008). No reservatório de Três Marias, rio São Francisco, crescimento alométrico positivo foi detectado tanto para fêmeas quanto para machos de duas espécies de Prochilodontidae, que não se reproduzem no reservatório (ARANTES *et al.*, 2011a). Valores de *b* na relação peso-comprimento significativamente diferentes de 3,0 foram obtidos para vários caracídeos do reservatório de Itaipu, bacia do rio Paraná, Brasil (BENEDITO-CECILIO *et al.*, 1997). De acordo com BAGENAL & TESCH (1978), a relação peso-comprimento varia com a espécie, sexo, populações de uma mesma espécie, fases do ciclo de vida e condições ambientais.

O aumento da temperatura da água e redução do oxigênio dissolvido e do pH em novembro coincidem com período de aumento da pluviosidade e de maior atividade reprodutiva, quando o dourado *S. franciscanus* depende de estímulos ambientais como gatilho para sua migração e desova, similar a outros peixes de piracema, como *P. argenteus* (SATO & GODINHO, 2003; SATO *et al.*, 2005) e *P. coruscans* (BRITO & BAZZOLI, 2003). Esses resultados indicam que os parâmetros da água do rio São Francisco foram adequados à reprodução de *S. franciscanus* no trecho após a foz do rio Abaeté. Em contraste, no trecho a montante do rio Abaeté, a água proveniente do hipolímnio do reservatório de Três Marias prejudica a maturação gonadal de peixes migradores, como evidenciado pela alta frequência de peixes em repouso, pelo aumento da atresia folicular nas fêmeas e pela menor produção espermática nos machos de *P. argenteus* (ARANTES *et al.*, 2010; DOMINGOS *et al.*, 2012). A transparência da água menor em fevereiro e maio pode ser relacionada ao aumento da carga de matéria orgânica proveniente da estação chuvosa provendo nutrientes para o crescimento de peixes jovens (ALVARENGA *et al.*, 2006), os quais podem servir de alimento para os peixes piscívoros como o dourado *S. franciscanus*.

FOLICULOGÊNESE E FECUNDIDADE

A gametogênese de machos e fêmeas de *S. franciscanus* seguiu o padrão descrito para outras espécies de fertilização externa, incluindo os caracídeos *Salminus hilarii* (HONJI *et al.*,

2009) e *B. orthotaenia* (GONÇALVES *et al.*, 2006). Diferente dos mamíferos, nos peixes, a divisão mitótica das ovogônias localizadas no epitélio germinativo mantém o estoque de células germinativas ao longo de toda a vida do peixe (JALABERT, 2005). Durante a folliculogênese, ovócitos de peixes passam por três principais estádios de desenvolvimento regulados por gonadotrofinas, esteroides sexuais e fatores parácrinos (LUBZENS *et al.*, 2010): crescimento primário, crescimento secundário e maturação final ovocitária, caracterizada pela migração do núcleo em direção à micrópila, onde ocorre a quebra da vesícula germinativa para permitir a fertilização. Similar a outras espécies de peixes de água doce, no estágio de repouso, as lamelas ovulíferas apresentaram ninhos de ovogônias e folículos perinucleolares, na maturação inicial formaram-se os folículos pré-vitelogênicos, enquanto que na maturação avançada os ovários apresentaram acúmulo de folículos vitelogênicos (BAZZOLI, 2003; MARTINS *et al.*, 2010; THOMÉ *et al.*, 2010). Além disso, a formação da zona pelúcida teve início na fase perinucleolar, tornando-se espessada e com duas camadas nos folículos vitelogênicos maduros, como também observado em outros peixes caracídeos (ANDRADE *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2004; GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2005; HONORATO-SAMPAIO *et al.*, 2009).

Em cortes histológicos, o diâmetro dos folículos ovarianos de *S. franciscanus* atingiu cerca de 700 µm na fase vitelogênica, diâmetro similar ao encontrado em outros Characiformes migradores, tais como *P. argenteus*, *P. costatus* e *B. orthotaenia* (ARANTES *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2006). Em geral, ovócitos de pequeno tamanho, que são carregados pela correnteza do rio a locais apropriados ao seu desenvolvimento, são associados a espécies de peixes com ovos livres e alta fecundidade, tais como *P. argenteus* e *S. franciscanus*. Em contraste, ovócitos de grande diâmetro são frequentemente relacionados a espécies com ovos adesivos, fecundidade baixa e que cuidam da prole, tais como as traíras *Hoplias malabaricus* e *Hoplias lacerdae* (GOMES *et al.*, 2007) e o tucunaré *Cichla kelberi* (NORMANDO *et al.*, 2009). Em peixes submetidos à desova induzida por hipofiseação, o diâmetro do ovócito liberado de *S. franciscanus* foi de ~1600 µm, atingindo ~2500 µm após hidratação e formação do espaço perivitelino, sendo esse fenômeno importante para proteger o embrião em desenvolvimento, uma vez que a espessura da zona radiata é mais fina nos ovos livres, como em *S. franciscanus*, do que nas espécies com ovos adesivos (SATO *et al.*, 2003).

Na fase pós-desova, ovários de *S. franciscanus* apresentaram folículos perinucleolares associados a folículos pós-ovulatórios e atrésicos em diferentes fases de regressão, característica de peixes com desova total, como observado em outros Characiformes incluindo

B. orthotaenia, *P. argenteus* e *S. hilarii* (GONÇALVES *et al.*, 2006; HONJI *et al.*, 2009; ARANTES *et al.*, 2010).

No presente trabalho, a fecundidade absoluta do dourado sob condições de cultivo variou de 160 a 450 mil ovos por fêmea e de 200 a 800 mil ovos em estudo prévio (SATO *et al.*, 1997), essas diferenças podem ser justificadas pelas variações no tamanho das fêmeas. Em espécies migradoras, incluindo *S. franciscanus*, a alta fecundidade está associada a ovócitos não adesivos e ausência de cuidado parental, e sua avaliação é essencial para assegurar a exploração racional e manejo dos recursos de pesca (SATO *et al.*, 2003; MELO *et al.*, 2011a). Além disso, a redução da fecundidade pode estar relacionada com impactos ambientais (ARANTES *et al.*, 2010). Para eliminar o efeito do tamanho do peixe, foi calculada a fecundidade relativa ao comprimento e ao peso corporal, e os valores do R^2 indicaram melhor associação entre a fecundidade e o peso corporal, como também detectado para o tucunaré *Cichla kelberi* (NORMANDO *et al.*, 2009) e curimatã-pacu *P. argenteus* (ARANTES *et al.*, 2010).

Como em outras espécies de fertilização externa, ovócitos desovados de *S. franciscanus* apresentaram micrópila em forma de funil, com diâmetro do canal micropilar semelhante ao da cabeça do espermatozoide, permitindo a penetração de um único espermatozoide durante a fertilização, uma característica importante no bloqueio à polispermia (RIZZO & BAZZOLI, 1993; RIZZO *et al.*, 1997). No polo animal, a zona radiata exibiu numerosos poros-canais ao redor da micrópila, como observado em ovos do dourado e de outros Characiformes (RIZZO & BAZZOLI, 1993), constituindo um arranjo especializado para facilitar as trocas metabólicas durante a embriogênese. No polo vegetativo, ovos adesivos de algumas espécies de peixes Characiformes apresentam estruturas especializadas para fixação do ovo a diferentes tipos de substrato, enquanto que em ovos livres, como os de *Salminus* e *Brycon*, observam-se os poros-canais da zona radiata na superfície ovocitária ou fina rede fibrilar recobrimdo a zona radiata. Esses arranjos da superfície ovocitária constituem os padrões mais simples de organização estrutural da superfície de ovos de peixes que são relacionados a desovadores pelágicos, que espalham ovos sem cuidado parental, sendo ancestrais na evolução de peixes (RIZZO *et al.*, 2002).

ESPERMATOGÊNESE

Como na maioria dos Characiformes, a espermatogênese de *S. franciscanus* é um processo contínuo que ocorre em estruturas funcionais, os espermatocistos, localizados no interior dos túbulos seminíferos, sendo dividida em três principais fases: mitótica ou espermatogonial, meiótica ou espermatocitária, e espermiogênica, quando as espermatídes sofrem progressivas mudanças no núcleo e citoplasma culminando com a formação dos espermatozoides (SCHULZ & MIURA, 2002; SCHULZ *et al.*, 2010). A espermatogônia tipo A indiferenciada apresenta-se em cisto como célula única, com grande núcleo e nucléolo evidente; espermatogônia tipo A diferenciada, principalmente em pares, com núcleo arredondado e nucléolo evidente; espermatogônia tipo B, a partir de quatro por cisto, núcleo reduzido com cromatina em regiões esparsas e nucléolo; espermatócitos primários, núcleo ovoide com cromatina organizada em diferentes fases da divisão meiótica; espermatócitos secundários, núcleo arredondado com volume reduzido e cromatina densa; espermatídes, altamente compactadas com cromatina em diferentes fases de compactação; espermatozoides, cabeça arredondada com cromatina extremamente condensada e em grumos. O processo de proliferação, redução citoplasmática e compactação da cromatina observados neste estudo corroboram o trabalho de DOMINGOS *et al.* (2012) com *Prochilodus argenteus*.

A espermatogênese de *S. franciscanus* é do tipo cística (VERÍSSIMO-SILVEIRA *et al.*, 2006), com espermatogônias distribuídas ao longo de todo o comprimento dos testículos, tipo irrestrito, seguindo o padrão descrito para outros caracídeos, como *Galeocharax knerii* (MAGALHÃES *et al.*, 2004), *A. bimaculatus*, *Astyanax fasciatus*, *Bryconops affinis* (MARTINS *et al.*, 2012), *B. orthotaenia* (GONÇALVES *et al.*, 2006) e *P. argenteus* (DOMINGOS *et al.*, 2012). A secreção acidófila detectada no lume dos túbulos seminíferos de *S. franciscanus* é também observada em outros Characiformes, como os lambaris *A. bimaculatus* e *A. fasciatus* (MARTINS *et al.*, 2012) e *B. orthotaenia* (GONÇALVES *et al.*, 2006), e pode ter importante função energética para os espermatozoides.

Durante o processo espermatogênico, a partir da diferenciação das espermatogônias, durante a fase de meiose até a espermiogênese, as células da linhagem germinativa passam por intensas mudanças estruturais incluindo a redução citoplasmática e nuclear (MAGALHÃES *et al.*, 2004), como evidenciada pela morfologia e ultraestrutura em *S. franciscanus* no presente estudo.

A ultraestrutura das células espermatogênicas de *S. franciscanus* revelou detalhes principalmente do padrão de condensação da cromatina ao longo do processo

espermatogênico até a formação dos espermatozoides, das características citoplasmáticas e das características das fases de desenvolvimento testicular, sendo relevantes os estudos que lançam mão dessas técnicas, incluindo estudos filogenéticos (QUAGIO-GRASSIOTTO, 2001b). Durante a espermiogênese, *S. franciscanus* apresenta núcleo arredondado com cromatina condensada irregularmente que tende a se condensar mais e formar fibras mais espessas até a formação dos espermatozoides. Ao mesmo tempo, anéis membranosos concêntricos (várias camadas de membranas) envolvem a parte interna da membrana plasmática das espermatídes. Segundo VERÍSSIMO-SILVEIRA *et al.* (2006), o número desses anéis diminui ao passo que a espermiogênese avança, sendo maiores na porção inicial do flagelo em espermatídes iniciais e menores ao longo do canal citoplasmático nas espermatídes tardias e nos espermatozoides. As características ultraestruturais relacionadas aos anéis membranosos concêntricos de *S. franciscanus* corroboram as encontradas por VERÍSSIMO-SILVEIRA *et al.* (2006) para os gêneros *Salminus* e *Brycon*, não ocorrendo em outros caracídeos. O padrão 9 + 2 do axonema está de acordo com outras espécies de teleósteos como *Steindachnerina insculpta*, *Cyphocharax gillii*, *C. modestus*, *C. spilottus* e *Potamorhina altamazonica* (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003). O núcleo dos espermatozoides de *S. franciscanus* apresentou forma arredondada, assim como reportado para outros caracídeos como *S. brasiliensis*, *B. microlepis*, *B. orbigyanus* (VERÍSSIMO-SILVEIRA *et al.*, 2006) e *H. malabaricus* (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2001a).

ATIVIDADE REPRODUTIVA E MATURAÇÃO GONADAL

No presente estudo, peixes em repouso foram capturados em todas as amostragens, enquanto a maior frequência de fêmeas em maturação e desova ocorreram entre outubro e janeiro, e os machos entre agosto e março, sugerindo que a atividade testicular é contínua e mais prolongada do que em fêmeas, podendo otimizar a produção de ovos fertilizados e garantir o sucesso reprodutivo da espécie (SCHULZ *et al.*, 2010). No período pós-desova (fevereiro a maio), ocorreu a regressão dos folículos pós-ovulatórios e atresícos, para os ovários retornarem à fase de repouso e iniciar um novo ciclo reprodutivo. Folículos pós-ovulatórios são biomarcadores histológicos da desova, enquanto a taxa elevada de atresia folicular é característica de ambientes impactados (PRADO, 2009). Semelhante ao que ocorre em outras espécies, as células foliculares entram em hipertrofia nos folículos pós-ovulatórios precedendo a morte celular por apoptose, que é responsável pela eliminação dessas células

durante a regressão folicular (SANTOS *et al.*, 2005, 2008; THOMÉ *et al.*, 2010). Na atresia folicular, a hipertrofia das células foliculares é mantida enquanto estas células estão envolvidas na fagocitose do vitelo, e o relacionamento entre autofagia e apoptose é crítico na regressão folicular (MORAIS *et al.*, 2012).

Os valores de IGS de *S. franciscanus* acompanharam as variações sazonais da maturação gonadal, com maiores valores no estágio 2 (maturação) e no bimestre outubro/novembro, quando peixes em maturação foram frequentes. Os altos valores do IGS de fêmeas, quando comparados aos machos, refletem o alto investimento em reprodução e intensa atividade ovariana (LUBZENS *et al.*, 2010). Os menores valores de IGS ocorreram em junho/julho e agosto/setembro, período de repouso. Os valores de K foram mais elevados nos estádios 2 e 3, especialmente em fêmeas, indicando acúmulo de reservas energéticas para a reprodução (SATO *et al.*, 2005; NORMANDO *et al.*, 2009). Após a desova/espermiacão, (fevereiro/março), os valores de K foram mais baixos principalmente nas fêmeas devido ao consumo das reservas energéticas durante o período reprodutivo. Diferentemente das fêmeas, nos machos as variações do K foram pouco expressivas e não refletem as variações da atividade reprodutiva, como tem sido reportado para outros caracídeos (MAGALHÃES *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2011).

PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR E EXPRESSÃO DE IGF1

A imunolocalização de PCNA e IGF1, bem como a reação de TUNEL para células em apoptose foram demonstradas neste trabalho em testículos de *S. franciscanus*. As marcações de PCNA e TUNEL ocorreram nas fases proliferativa e espermatocitária da espermatogênese tal como detectado em outras espécies (MIURA *et al.*, 2002; DOMINGOS *et al.* 2012). O PCNA é um fator essencial para a replicação do DNA, sendo sua imunorreatividade um excelente marcador para avaliação da proliferação celular (SRIRAMAN *et al.*, 2000; BELL & DUTTA, 2002; GUERQUIN *et al.*, 2010) enquanto a reação de TUNEL *in situ* tem sido frequentemente utilizada para detecção da apoptose em diferentes tecidos (THOMÉ *et al.*, 2012). Estrógenos e LH são relacionados com a manutenção da expressão de PCNA e atividades de proliferação celular inclusive na espermatogênese (SCHULZ *et al.*, 2010). De acordo com SRIRAMAN *et al.* (2000), LH mantém os níveis de PCNA nas células de Leydig bem como regula o sistema IGF1, sendo que a redução de PCNA faz com que as células de Leydig percam a capacidade de proliferação. A imunolocalização de PCNA principalmente

em espermatogônias, espermátocitos e células somáticas do testículo de *S. franciscanus* seguiu o padrão descrito para o teleósteo *Prochilodus argenteus*, indicando a atividade proliferativa na gônada, sendo um marcador útil para avaliação da espermatogênese, inclusive em condições de impacto ambiental (DOMINGOS *et al.*, 2012).

A apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre naturalmente, sendo importante para manutenção da homeostase tecidual, mas também ocorre em situações de dano celular (GUIMARÃES & LINDEN, 2004; KRYSKO *et al.*, 2008). O processo é conservado na evolução de vertebrados, sendo uma ferramenta útil para detecção de impacto ambiental em teleósteos (MIRANDA *et al.*, 1999). A apoptose apresenta papel importante no desenvolvimento de tecidos e órgãos dos metazoários (DRUMMOND *et al.*, 2000), atuando tanto no desenvolvimento quanto na regressão folicular após a desova (BLAZER, 2002; THOMÉ *et al.*, 2012) e espermatogênese (DOMINGOS *et al.*, 2012). Durante a espermatogênese de *S. franciscanus*, as marcações TUNEL-positivas ocorreram principalmente em espermatogônias e espermátocitos, indicando que até a fase meiótica ocorrem momentos críticos para a eliminação de células defeituosas. Na fase espermiogênica, a apoptose é menos evidenciada, como também se observou no presente estudo.

Nos processos de proliferação e morte celular, o sistema IGF interfere direta ou indiretamente na regulação das células que devem ou não sobreviver, crescer, dividir ou morrer (PERROT *et al.*, 2000; REINECKE, 2010). O sistema IGF inclui peptídeos identificados em vários vertebrados, tais como IGF1, IGF2 e IGF3. Em mamíferos, o envolvimento do sistema IGF tem sido descrito na fisiologia e maturação ovariana e testicular (LI *et al.*, 2010). Dentre vários descritos, IGF1 consiste num polipeptídeo de 7 kDa (MORIYAMA *et al.*, 1994) que se destaca como um fator essencial em várias espécies de peixes, desempenhando funções como crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (KAGAWA, 1995). A última função tem sido sugerida pela atividade de mitogênese e diferenciação bem como de inibição da apoptose (REINECKE, 2010). Nesse mesmo trabalho, os receptores de IGF foram reportados para testículos e ovários de teleósteos como truta e tilápia.

No presente estudo, foi observada a imunolocalização de IGF1 em diferentes fases de desenvolvimento testicular de *S. franciscanus*, sendo a marcação esparsa no citoplasma das células germinativas e somáticas. PERROT *et al.* (2000) observaram em *Sparus aurata* a reação imuno-histoquímica para IGF1 principalmente ao redor dos cistos espermatogênicos, em células de Sertoli como também em células intersticiais e em algumas espermatogônias tipo A, como observado no presente trabalho.

O IGF1 atua estimulando de forma autócrina e parácrina a proliferação celular, inibindo a apoptose e, dessa forma, atuando na regulação da espermatogênese, principalmente nas fases espermatogonial e espermatocitária. Sendo assim, IGF1 contribui para o balanço entre proliferação e morte celular. Novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais os diferentes tipos de IGFs mantêm suas funções celulares em peixes neotropicais, inclusive em fêmeas, além de sua relação com hormônios na reprodução.

Em síntese, os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações sobre a maturação gonadal, reprodução e células germinativas do dourado *S. franciscanus*, sendo esses dados importantes para auxiliar a implementação de programas de conservação desta espécie nativa do rio São Francisco, bem como de áreas prioritárias incluindo a vegetação ciliar e o curso do rio Abaeté; além de subsídios para as técnicas de reprodução induzida e cultivo desta espécie.

CONCLUSÕES

- O curto período de desova/espermição (outubro a janeiro) associado às características histológicas dos ovários desovados, ou seja, exibindo folículos perinucleolares associados a folículos pós-ovulatórios e atrésicos, indicam que a espécie apresenta desova total;
- As análises das frequências dos estádios de maturação gonadal, variações de IGS e K associadas às características morfológicas das células germinativas indicam que *S. franciscanus* reproduz-se no alto rio São Francisco, no período de outubro a janeiro, apresenta desova total, ovos livres e alta fecundidade;
- As reações imuno-histoquímicas em testículos fornecem evidências do relacionamento entre IGF1 e os processos de proliferação e apoptose na regulação da espermatogênese de *S. franciscanus*;
- A presença de um tributário não regulado, rio Abaeté, que apresenta condições favoráveis à reprodução de peixes migradores, pode ser responsável pelo sucesso reprodutivo do dourado *S. franciscanus* no rio São Francisco, a jusante da barragem hidrelétrica de Três Marias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. F. L.; KRISTOFFERSEN, C.; TARANGER, G. L.; SCHULZ, R. W. Spermatogenesis in atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel model of cystic germ cell development. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 27-34, 2008.

ALVARENGA, E. R.; BAZZOLI, N.; SANTOS, G. B.; RIZZO, E. Reproductive biology and feeding of *Curimatella lepidura* (Eigenmann & Eigenmann) in Juramento reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 314-322, 2006.

ANDRADE, R. F.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). **Tissue & Cell**, v. 33, p. 524-32, 2001.

ARANTES, F. P. Fecundidade total e liberada em peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco, MG. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2004. 37 p.

ARANTES, F. P.; SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Collapse of the reproductive process of two migratory fish (*Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*) in the Três Marias Reservoir, São Francisco River, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, p. 847-853, 2011a.

ARANTES, F. P.; SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimatã-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 172, p. 400-8, 2011b.

ARANTES, F. P.; SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 330-6, 2010.

BAGENAL, T. B.; BRAUM, E.. Eggs and early life history. In: BAGENAL, T. B. (Ed.), Methods for assessment of fish production in fresh waters. IBP Handbook 3. **Blackwell Scientific**, Oxford, p. 165-201, p. 365, 1978.

BAGENAL, T. B., TESCH, F. W. Age and growth. In: BAGENAL, T. B. (Ed), Methods for assessment of fish production in fresh waters. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, p. 101-136, 1978.

BAZZOLI, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. p. 291-306. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: **PUC Minas**, 2003. 468 p.

BELL, S. P.; DUTTA, A. DNA replication in eukaryotic cells. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 333-74, 2002.

BENEDITO-CECILIO, E.; AGOSTINHO, A. A.; CARNELÓS-MACHADO, V. R. C. Length-weight relationship of fishes caught in the Itaipu Reservoir, Paraná, Brazil. **Naga, The ICLARM Q**, 57-61, 1997.

BLAZER, V. S. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 85-101, 2002.

BRITO, M. F. G., BAZZOLI, N. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 55, p. 624-633, 2003.

CARVALHO, P. A.; PASCHOALINI, A. L.; SANTOS, G. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, p. 306-313, 2009.

CORRIERO, A.; DESANTIS, S.; BRIDGES, C. R.; KIME, D. E.; MEGALOFONOU, P.; SANTAMARIA, N.; CIRILLO, F.; VENTRIGLIA, G.; DI SUMMA, A.; DEFLORIO, M.; CAMPOBASSO, E.; DE METRIO, G. Germ cell proliferation and apoptosis during different phases of swordfish (*Xiphias gladius* L.) spermatogenetic cycle. **Journal of Fish Biology**, v. 70, p. 83-99, 2007.

DE ROOIJ, D. G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. **Reproduction**, v. 121, p. 347-354, 2001.

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 Physiology and Biochemistry**, 2012.

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

DRUMMOND, G. M.; MARTINS, C. S.; MACHADO, A. B. M.; SEBAIO, F. A.; ANTONINI, Y. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. 2. ed. Belo Horizonte: **Fundação Biodiversitas**, 2005. 222 p.

GODINHO, A. L.; LAMAS, I. R.; GODINHO, H. P. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. **Environmental Biology of Fishes**, v. 87, p. 143-162, 2010.

GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: **PUC Minas**, 2003. 468 p.

GOMES, B. V. C.; SCARPELLI, R. S.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Comparative oocyte morphology and early development in three species of trahiras from the São Francisco River Basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 70, 1412-1429, 2007.

GONÇALVES, T. L.; BAZZOLI, N.; BRITO, M. F. G. Gametogenesis and reproduction of the matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) (Pisces: Characidae) in the São Francisco river, Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 513-22, 2006.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**, v. 21, p. 345-357, 1981.

GUERQUIN, M.-J.; DUQUENNE, C.; LAHAYE, J.-B.; TOURPIN, S.; HABERT, R.; LIVERA, G. New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. **Developmental Biology**, v. 346, p. 320-30, 2010.

GUIMARÃES, A. C. D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Cytochemical characterization of the endomembranous system during the oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Tissue & Cell**, v. 37, p. 413-22, 2005.

GUIMARÃES, C. A.; LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v. 271, p. 1638-50, 2004.

HONJI, R. M.; NARCIZO, A. M.; BORELLA, M. I.; ROMAGOSA, E.; MOREIRA, R. G. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 109-23, 2009.

HONORATO-SAMPAIO, K.; SANTOS, G. B.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Observations on the seasonal breeding biology and fine structure of the egg surface in the white piranha *Serrasalmus brandtii* from the São Francisco River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 1874-82, 2009.

HSUEH, A. J. W.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine Reviews**, v. 15, p. 707-724, 1994.

ISAAC-JÚNIOR, J. B. Gametogênese e ciclo reprodutivo do dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae), do rio São Francisco, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 1999. 89 p.

JALABERT, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, 261-279, 2005.

KAGAWA, H.; MORIYAMA, S.; KAWAUCHI, H. Immunocytochemical localization of IGF-I in the ovary of the red seabream, *Pagrus major*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 99, p. 307-315, 1995.

KOULISH, S.; KRAMER, C. R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, v. 254, p. 292-311, 2002.

KRYSKO, D. V.; DIEZ-FRAILE, A.; CRIEL, G.; SVISTUNOV, A. A.; VANDENABEELE, P.; D'HERDE, K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. **Apoptosis**, v. 13, p. 1065-1087, 2008.

LI, J.; LIU, Z.; WANG, D; CHENG, C. H. K. Insulin-like growth factor 3 is involved in oocyte maturation in zebrafish. **Biology of Reproduction**, v. 110, p. 1-17, 2010.

LIMA, F. C. T; BRITSKI, H. A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 237-244, 2007.

LO NOSTRO, F.; GRIER, H.; ANDREONE, L.; GUERRERO, G. A. Involvement of the gonadal germinal epithelium during sex reversal and seasonal testicular cycling in the protogynous swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). **Journal of Morphology**, v. 257, p. 107-126, 2003.

LOWE-MCCONNELL, R. Ecological studies in tropical fish communities. London: **Cambridge University Press**, p. 382, 1987.

LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÀ, J. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 367-389, 2010.

MAGALHÃES, A. L. B.; BAZZOLI, N.; SANTOS, G. B; RIZZO, E. Reproduction of the South American dogfish characid, *Galeocharax knerii*, in two reservoirs from upper Paraná River basin, Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 70, 415-425, 2004.

MARTINS, Y. S.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; SANTOS, J. E.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative analysis of gonadal morphology in six fish species of the Incertae Sedis genera in Characidae of occurrence in the São Francisco River Basin, Brazil. **Acta Zoologica**, v. 93, p. 48-56, 2012.

MARTINS, Y. S.; MOURA, D. F. DE; SANTOS, G. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative folliculogenesis and spermatogenesis of four teleost fish from a Reservoir in south-eastern Brazil. **Acta Zoologica**, v. 91, p. 466-473, 2010.

MAZAUD, S.; GUYOT, R.; GUIGON, C. J.; COUDOUEL, N.; LE MAGUERESSE-BATTISTONI, B; MAGRE, S. Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families. **Developmental Biology**, v. 277, p. 403-416, 2005.

MELO, R. M. C.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; SANTOS, J. E.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). **Journal of Morphology**, v. 272, p. 525-35, 2011a.

MELO, R. M. C.; FERREIRA, C. M.; LUZ, R. K.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative oocyte morphology and fecundity of five characid species from São Francisco River basin, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, p. 1332-1336, 2011b.

MIRANDA, A. C. L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. **Tissue & Cell**, v. 31, p. 480-488, 1999.

MIURA, C.; MIURA, T.; YAMASHITA, M. PCNA protein expression during spermatogenesis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Zoology Science**, v. 19, p. 87-91, 2002.

MORAIS, R. D. V. S.; THOMÉ, R. G.; LEMOS, F. S.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study. **Cell and Tissue Research**, v. 347, p. 467-78, 2012.

MORIYAMA, S.; SWANSON, P.; NISHII, M.; TAKAHASHI, A.; KAWAUCHI, H.; DICKHOFF, W. W.; PLISETSKAYA, E. M. Development of a homologous radioimmunoassay for coho salmon insulin-like growth factor-I. **General and Comparative Endocrinology**, V. 96, P. 149-161, 1994.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Develop. Growth Differ**, v. 50, p. 195-219, 2008.

NORMANDO, F. T.; ARANTES, F. P.; LUZ, R. K.; THOMÉ, R. G.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Reproduction and fecundity of tucunaré, *Cichla kelberi* (Perciformes: Cichlidae), an exotic species in Três Marias Reservoir, Southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, p. 299-305, 2009.

OLAYA-NIETO, C.; TORDECILLA-PETRO, G.; SEGURA-GUEVARA, F. Relación longitud-peso del rubio (*Salminus affinis* Steindachner, 1880) en la cuenca del río Sinú, Colombia. **Revista MVZ Córdoba**, v. 13, p. 1349-1359, 2008.

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

PERROT, V.; MOISEEVA, E. B.; GOZES, Y.; CHAN, S. J.; FUNKENSTEIN, B. Insulin-like growth factor receptors and their ligands in gonads of a hermaphroditic species, the gilthead seabream (*Sparus aurata*): expression and cellular localization. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 229-241, 2000.

PRADO, P. S. Avaliação da atividade reprodutiva e de biomarcadores de impacto ambiental no lambari *Astyanax fasciatus* do Reservatório de Furnas, Rio Grande. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2009.

PRADO, P. S.; SOUZA, C. C.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1879-87, 2011.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GAMEIRO, M. C.; SCHNEIDER, T.; MALABARBA, L. R.; OLIVEIRA, C. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the Curimatidae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the Characiformes. **Neotropical Ichthyology**, v. 1, p. 35-45, 2003.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I; NEGRÃO, J. N. C; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). **Journal of Fish Biology**, v. 59, p. 1494-1502, 2001a.

- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI, A. E. The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. **Journal of Fish Biology**, v. 58, p. 1623-1632, 2001b.
- RADAELLI, G.; POLTRONIERI, C.; SIMONTACCHI, C.; NEGRATO, E.; PASCOLI, F.; LIBERTINI, A.; BERTOTTO, D. Immunohistochemical localization of IGF-I, IGF-II and MSTN proteins during development of triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **European Journal of Histochemistry**, v. 54, p. 74-80, 2010.
- REDDING, J. M.; PATIÑO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D. H.: The physiology of fishes. CRC Press, Inc., USA, 1993. 592p.
- REINECKE, M. Insulin-like growth factors and fish reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 656-661, 2010.
- RICARDO, M. C. P.; AGUIAR, C. A.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Morfologia da micrópila e da célula micropilar em teleósteos neotrópicos de água doce. **Arquivo Brasileiro de Med. Vet. Zootec.**, v. 48, n. 1, p. 17-24, 1996.
- RIEHL, R.; PATZNER, R. A. The modes of egg attachment in teleost fishes. **Italian Journal of Zoology**, v. 65, p. 415-420, 1998.
- RIEHL, R. Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. **Microscopy and Analysis**, p. 29-31, 1993.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, p. 697-703, 1995.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces: Characiformes). **European Archives of Biology**, Zutendall, v. 104, p. 1-6, 1993.
- RIZZO, E.; GODINHO, H. P.; SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. **Theriogenology**, v. 60, p. 1059-1070, 2003.
- RIZZO, E.; RIBEIRO, D. M.; BAZZOLI, N.; DABÉS, A. C.; MAGALHÃES, A. L. B.; ANDRADE, R. F. Final oocyte maturation and fertilization in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) and curimbatá *Prochilodus scrofa* (Pisces: Prochilodontidae) submitted to hypofisiation. **Brazilian Journal of Morphology**, v. 14, p. 13-18, 1997.
- RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B. P.; GODINHO, H. P. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 615-632, 2002.
- RODRIGUES, S. S.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, v. 21, p. 65-75, 2008.
- ROLAKI, A.; DRAKAKIS, P.; MILLINGOS, S.; LOUTRADIS, D.; MAKRIGIANNAKIS, A. Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 11, p. 93-103, 2005.

SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N.; SATO, Y.; MORO, L. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. **Journal of Fish Biology**, v. 67, 1446-1459, 2005.

SANTOS, H. B.; SATO, Y.; MORO, L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Relationship among follicular apoptosis, integrin $\beta 1$ and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. **Cell and Tissue Research**, v. 332, p. 159-170, 2008.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 163-171, 2002.

SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; BOSCHI, M. B.; MIRANDA, M. O. T. Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias dam, Southeastern Brazil. **River Research and Applications**, v. 21, p. 939-950, 2005.

SATO, Y.; CARDOSO, E. L.; GODINHO, A. L.; GODINHO, H. P. Hypophysation parameters of the fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station conditions. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, 59-64, 1996.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. P. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. p. 275-289. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: **PUC Minas**, 2003. 468 p.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R.; GODINHO, H. P.; VIEIRA, L. J. S. Reprodução artificial do dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces: Characidae) da bacia do rio São Francisco. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p. 113-116, 1997.

SATO, Y.; GODINHO, H. P. Migratory fishes of the São Francisco River. p. 195-232. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. Victoria, BC: **World Fisheries Trust**, 2003. 372 p.

SATO, Y.; GODINHO, H.P. Peixes da bacia do rio São Francisco. In: LOWE-MCCONNELL, R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. p. 401-413. São Paulo: **Edusp**, 1999. 534 p.

SATO, Y. Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, **Universidade Federal de São Carlos**, 1999. 179 p.

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

SCHULZ, R. W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P. Sertoli cell proliferation in the adult testis – evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 891-898, 2005.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 43-56, 2002.

SOUZA, I. L.; SANTOS-SILVA, L. K.; VENERE, P. C.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. **Micron**, v. 39, p. 1036-1041, 2008.

SPIEGEL, M.R. Théorie et applications de la statistique. Paris: **McGraw-Hill**, p. 358, 1991.

SRIRAMAN, V.; RAO, V. S.; SAIRAM, M. R.; RAO, A. J. Effect of deprivation of LH on Leydig cell proliferation: involvement of PCNA, cyclin D3 and IGF-1. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 162, p. 113-120, 2000.

TAKLE, H.; ANDERSEN, Ø. Caspases and apoptosis in fish. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 326-349, 2007.

THOMÉ, R. G.; DOMINGOS, F. F. T.; SANTOS, H. B.; MARTINELLI, P. M.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. **Tissue & Cell**, v. 44, p. 54-62, 2012.

THOMÉ, R.; SANTOS, H. B.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Distribution of laminin β 2, collagen type IV, fibronectin and MMP-9 in ovaries of the teleost fish. **Journal of Molecular Histology**, v. 41, p. 215-24, 2010.

VAZZOLER, A. E. A. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. EDUEM, Maringá, São Paulo: **SBI**, p. 169, 1996.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; GUSMÃO-POMPIANI, P.; VICENTINI, C. A.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoologica**, v. 87, p. 305-313, 2006.

WOOD, A. W.; DUAN, C.; BERN, H. A. Insulin-like growth factor signaling in fish. **International Review of Cytology**, v. 243, p. 215-285, 2005.