

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

TESE DE DOUTORADO

**Influência da salinidade da água sobre a gametogênese da tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) em condições de cultivo**

Augusto Bicalho Cruz Vieira

Belo Horizonte

Fevereiro de 2018

AUGUSTO BICALHO CRUZ VIEIRA

**Influência da salinidade da água sobre a gametogênese da tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) em condições de cultivo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Elizete Rizzo

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro de 2018**

Esta tese foi realizada no Laboratório de Ictiohistologia (Labictio) do Departamento de Morfologia - Instituto de Ciências Biológicas (ICB), com apoio do Laboratório de Aquacultura (Laqua) - Escola de Veterinária, do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da Universidade Federal de Minas Gerais (CAPI-UFMG) e do Centro de Microscopia (CM) da Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADORA:
PROFA. DRA. ELIZETE RIZZO

APOIO FINANCEIRO E INSTITUCIONAL:

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



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
AUGUSTO BICALHO CRUZ VIEIRA**

188/2018
entrada
1º/2014
2014659570

Às **quatorze horas** do dia **28 de fevereiro de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**INFLUÊNCIA DA SALINIDADE DA ÁGUA SOBRE A GAMETOGENESE DA TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS) EM CONDIÇÕES DE CULTIVO**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em 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 de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Elizete Rizzo	UFMG	APROVADO
Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda	UFMG	Aprovado
Dr. Ronald Kennedy Luz	UFMG	Aprovado
Dr. Ralph Gruppi Thomé	UFJF	APROVADO
Dr. Laércio dos Anjos Benjamin	UFV	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2018.**

Dr.^a Elizete Rizzo (Orientadora) _____
Dr.^a Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda _____
Dr. Ronald Kennedy Luz _____
Dr. Ralph Gruppi Thomé _____
Dr. Laércio dos Anjos Benjamin _____

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

Profa. Fernanda Radicchi C. L. de Almeida
SUB-COORDENADORA DO PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR ICS/UFMG
F. Almeida

AGRADECIMENTOS

À minha família

À minha mãe

À minha esposa

À minha orientadora

Aos grandes amigos do Labictio (incluindo os que já passaram por lá)

Aos membros das bancas de qualificação e conclusão

Aos alunos do Laqua-Veterinária

Aos professores do Departamento de Morfologia

Aos criadores do Mendeley

Resumo

A tilápia do Nilo possui considerável potencial para cultivo em água de baixa salinidade. A pequena quantidade de água doce em alguns países, a competição com a agricultura e outras atividades urbanas aumentaram a pressão para desenvolver aquicultura em água salobra e água do mar. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar os níveis de HSP70, PCNA e caspase-3 em gônadas de *Oreochromis niloticus*, relacionando os dados obtidos com parâmetros reprodutivos incluindo vitelogenina (Vtg) hepática em fêmeas e concentrações plasmáticas de 11-ketotestosterona (11-KT), 17 β -estradiol (E2) e cortisol nos diferentes tratamentos de salinidade. Para isso, o estudo foi desenvolvido em duas etapas, utilizando tilápias sexualmente maduras. Na primeira etapa, o experimento foi realizado com machos ($58,94 \pm 2,64$ g de peso corporal) e na segunda com fêmeas ($398,5 \pm 128,5$ g). Os peixes foram submetidos a quatro tratamentos de salinidade com adição de NaCl em diferentes concentrações: (S0) água doce, (S7) 7 g/L, (S14) 14 g/L e (S21) 21 g/L. Análises histológica, morfométrica, molecular e dosagens plasmáticas de esteroides sexuais e cortisol, além de íons e lípidos foram realizadas em amostras de tecidos obtidas com 1, 4 e 9 dias para os machos e com 1, 2 e 3 semanas para as fêmeas. Os índices gonadossomático (IGS), hepatossomático (IHS) e fator de condição de Fulton (K) foram calculados. Todos os machos sobreviveram até o 9º dia enquanto as fêmeas de S21 morreram no dia seguinte ao início do experimento. Todos os exemplares estavam em atividade reprodutiva. Os diâmetros dos túbulos seminíferos foram menores em S7, S14 e S21 e os menores valores de IGS ocorreram em S14 e S21 para machos. Os valores de K não apresentaram variações nos machos, mas foram menores em S7 e S14 das fêmeas. Nas análises morfométricas, machos das salinidades mais elevadas apresentaram menos espermatozoides e as seguintes alterações histológicas foram observadas: presença de cistos vazios, aumento do tecido intersticial, hiperplasia e hipertrofia de células de Leydig. Nas fêmeas, não foram observadas alterações na proporção dos folículos ovarianos e nos valores do IGS, entretanto, os diâmetros dos folículos vitelogênicos foram maiores em S14. Infiltrado inflamatório e presença de granulócitos foram também observados nas gônadas de machos de S21 e em fêmeas de S14. As concentrações plasmáticas de 11-KT em machos e E2 em fêmeas não apresentaram variações significativas entre os tratamentos. Os níveis plasmáticos de cortisol foram mais elevados, enquanto os lipídios foram menores em fêmeas de S14. Nas análises moleculares, os níveis testiculares de HSP70 foram mais elevados no primeiro dia e reduziram posteriormente, quando foi observado aumento de caspase-3 e redução do PCNA aos 9 dias em S14 e S21. As marcações para PCNA ocorreram em cistos de espermatogônias, enquanto caspase-3 foi expressa em cistos de espermatídes e espermatozóides. Nos ovários, PCNA foi maior e caspase-3 foi menor em S7 em relação a S0 e S14 na terceira semana de tratamento. Nas fêmeas, os valores de IHS e Vtg hepática

foram menores em S14, onde observamos ovócitos deficientes em vitelo. Considerando que *O. niloticus* é o terceiro peixe mais cultivado do mundo e possui grande importância econômica, estudos relacionados à sua reprodução são cruciais para as culturas que dependem da nutrição e da economia que a tilápia fornece. Por outro lado, os impactos observados pela salinidade, no presente estudo, podem ser amplificados para a maioria das espécies de água doce, já que *O. niloticus* é um peixe eurialino com grande capacidade de adaptação, permitindo a essa espécie colonizar vários ecossistemas em detrimento de espécies nativas.

Palavras-chave: reprodução, apoptose, proliferação celular, proteínas de choque térmico, gametogênese.

Abstract

Nile tilapia has considerable potential for cultivation in low salinity water. The shortage of freshwater in many countries, competition with agriculture and other urban activities have increased the pressure to develop aquaculture in brackishwater and seawater. In this sense, this study aimed to evaluate the levels of HSP70, PCNA and caspase-3 in *Oreochromis niloticus* gonads, correlating data with reproductive parameters including hepatic vitellogenin (Vtg) in females, and plasma concentrations of 11-ketotestosterone (11-KT), 17 β -estradiol (E2), and cortisol in different salinity treatments. For this, the study was developed in two stages, using sexually mature tilapia. In the first stage, the experiment was performed with males (58.94 ± 2.64 g body weight), and the second with females (398.5 ± 128.5 g). The fish were submitted to four salinity treatments with NaCl addition in different concentrations: (S0) freshwater, (S7) 7 g/L, (S14) 14 g/L and (S21) 21 g/L. Histological, morphometric, molecular analysis and plasma levels of sexual steroids and cortisol, as well as ions and lipids were performed in samples of tissues at 1, 4 and 9 days for males and at 1, 2 and 3 weeks for females. The gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI) and Fulton's condition factor (K) were calculated. All males survived until the ninth day while all S21 females died on first day after the start of the experiment. All specimens were in reproductive activity. Seminiferous tubules diameters were lower in S7, S14 and S21 and the lowest GSI values occurred in S14 and S21 for males. K values showed no variation in males but were lower in S7 and S14 in females. In the morphometric analyses, spermatozoa were less numerous and histopathological changes were observed in higher salinities males: presence of empty cysts, increase of interstitial tissue and Leydig cell hyperplasia and hypertrophy. In females, no changes were observed in the proportion of ovarian follicles and in the GSI values, however vitellogenic follicles diameters were higher in S14. Inflammatory infiltrate and presence of granulocytes were also observed in S21 testis and S14 ovaries. Plasma concentrations of 11-KT in males and E2 in females did not show significant variations between treatments. Cortisol plasma levels were higher, while lipids were lower in S14 females. In the molecular analyses, HSP70 testicular levels were higher on the first day and then reduced, when increased caspase-3 and PCNA reduction at 9 days were observed in S14 and S21. PCNA labelling occurred in spermatogonia cysts whereas caspase-3 was expressed in spermatids cysts and spermatozoa. In the ovaries, PCNA was higher and caspase-3 was lower in S7 than in S0 and S14 on the third week of treatment. In females, HSI and hepatic Vtg values were lower in S14, where we observed yolk deficient oocytes. Considering that *O. niloticus* is the third most cultivated fish in the world, and that it has great economic importance, studies related to its reproduction are crucial for the cultures that depend on the nutrition and economy that tilapia provides. On the other hand, the impacts observed by salinity, in the present study, can be amplified

for most freshwater species, since *O. niloticus* is an euryhaline fish with great capacity of adaptation, allowing this species to colonize several ecosystems to the detriment of native species.

Key words: reproduction, heat shock protein, cell proliferation, apoptosis, testis, fish.

Lista de abreviações

- 11-KT** - 11-ketotestosterona
- 17- α P** - 17 α -hidroxiprogesterona
- AC** - alvéolos corticais
- A_{diff}** - espermatogônia tipo A diferenciada
- Apaf 1** - fator ativador de protease apoptótica
- A_{und}** - espermatogônia tipo A indiferenciada
- BrdU** - bromodesoxiuridina
- BSA** - albumina de soro bovino
- CT** - comprimento total
- DAPI** - 4,6-diamidino-2-phenyl-indole
- DNA** - ácido desoxirribonucleico
- E2** - 17 β -estradiol
- ELISA** - ensaio de imunoabsorção enzimática
- FA** - folículo atrésico
- FPO** - folículo pós-ovulatório
- FSH** - hormônio folículo estimulante
- HSPs** - proteínas de choque térmico
- IGS** - índice gonadossomático
- IHS** - índice hepatossomático
- ISE** - eletrodo íon-seletivo
- K** - fator de condição de Fulton
- LH** - hormônio luteinizante
- OPD** - o-fenilenodiamina dicloridrato
- PBS** - tampão fosfato-salino
- PC** - peso corporal
- PCNA** - antígeno nuclear de proliferação celular
- PF** - peso do fígado
- PG** - peso da gônada
- RNA** - ácido ribonucleico
- T** - testosterona
- TS** - túbulos seminíferos
- UV-Vis** - espectrofotometria ultravioleta visível
- Vtg** - vitelogenina
- ZP** - zona pelúcida

Lista de tabelas

Tabela 1. Concentração dos íons e de lípidos totais em homogenatos de testículos, ovários e plasma sanguíneo de <i>O. niloticus</i> nos diferentes tratamentos.....	34
Tabela 2. Diâmetro médio de ovócitos vitelogênicos e proporção de folículos em ovários de <i>O. niloticus</i> nos diferentes tratamentos.....	34

Lista de figuras

Figura 1- Comparação entre testículos de mamíferos e de peixes	16
Figura 2- Componentes testiculares	18
Figura 3- Desenvolvimento dos ovócitos em relação à meiose em peixes teleósteos.....	20
Figura 4- Atuação de hormônios na espermatogênese e na ovogênese	22
Figura 5- Machos: índice gonadosomático, fator de condição de Fulton, proporção dos componentes testiculares, diâmetro dos túbulos seminíferos e concentrações plasmáticas de 11-KT	35
Figura 6- Fêmeas: índice gonadosomático, índice hepatossomático, fator de condição de Fulton, concentrações plasmáticas de estradiol e concentrações plasmáticas de cortisol.....	35
Figura 7- Secções histológicas de testículos de <i>O. niloticus</i>	36
Figura 8- Secções histológicas de ovários de <i>O. niloticus</i>	37
Figura 9- Variações testiculares de HSP70, PCNA e caspase-3.....	38
Figura 10- Variações ovarianas de HSP70, PCNA e caspase-3	38
Figura 11- Variações hepáticas de vitelogenina	38

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1 Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	13
1.2 Tolerância de tilápias à salinidade.....	14
1.3 Testículos de teleósteos: anatomia e estrutura geral	15
1.4 Ovários de teleósteos: anatomia e estrutura geral.....	16
1.5 Gametogênese.....	16
1.5.1 Espermatogênese.....	17
1.5.2 Ovogênese.....	18
1.6 Fisiologia da reprodução	21
1.7 Proliferação celular em gônadas	22
1.8 Apoptose	23
1.9 Indicadores de estresse: cortisol, lipídios e íons séricos e proteínas de choque térmico – HSPs.....	24
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Experimentos.....	26
4.2 Amostragem dos peixes	27
4.3 Concentrações de íons e lipídios	27
4.4 Histologia e morfometria das gônadas.....	27
4.5 Níveis hormonais no plasma sanguíneo	28
4.6 Imunolocalização de PCNA e caspase-3 nos testículos	29
4.7 Ensaios de ELISA para HSP70, PCNA e vitelogenina	29
4.8 Teste colorimétrico para caspase-3.....	30
4.9 Análise estatística	30
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Biometria e índices biológicos.....	30
5.2 Concentrações de íons e lipídios	31
5.3 Histofisiologia gonadal e gametogênese.....	31
5.4 HSP70, PCNA e caspase-3 ativa nas gônadas	32
5.5 Níveis hepáticos de vitelogenina	33
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
9. ANEXOS	57

1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura continental brasileira é considerada a segunda maior da América do Sul ficando atrás apenas do Chile, produzindo principalmente tilápias e algumas espécies nativas como pacu e pintado (SUSSEL, 2013). Dentre as regiões que mais produzem pescado, destaca-se o nordeste brasileiro, com o Ceará consolidando-se como o maior produtor da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* no país (VIDAL, 2016). Além disso, o cultivo em tanques-rede tem-se intensificado em diversas regiões do país, incluindo Minas Gerais, que possui um grande potencial para o desenvolvimento da aquicultura. Devido à escassez de água e presença de água salobra subterrânea em grande parte do nordeste brasileiro, o cultivo de tilápia tende a se expandir para águas salobras, o que pode ser alternativa rentável para reutilização dos rejeitos da dessalinização da água de poços, diminuindo os impactos negativos dos rejeitos (BRITO; SILVA, 2014).

A salinização de rios e córregos provocada por mudanças climáticas afeta as comunidades de peixes, reduz a biomassa de espécies nativas e favorece a colonização dos ecossistemas de água doce por espécies tolerantes, como as tilápias (CAÑEDO-ARGÜELLES et al., 2013; JEPPESEN et al., 2015). Apesar de ser mais intensa em regiões áridas e semiáridas, a salinização é uma ameaça global que é também afetada por atividades humanas como agricultura, processos industriais e extração de recursos naturais (CAÑEDO-ARGÜELLES et al., 2013).

1.1 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Originária da África, a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Cichlidae) é uma das espécies de peixes de água doce mais cultivadas na aquicultura mundial (FAO, 2016). Esta espécie tem um ótimo potencial de reprodução devido à sua resistência, hábito alimentar onívoro, crescimento rápido, adaptação a diferentes condições e boas características organolépticas da sua carne (BHUJEL, 2000; LITTLE; HULATA, 2000). Além disso, a precocidade sexual e a capacidade de reproduzir durante todo o ano em temperaturas acima de 24°C garantem uma grande disponibilidade de alevinos desta espécie para o cultivo (EL-SAYED, 2006a). Na natureza, a tilápia do Nilo atinge a primeira maturação sexual a partir de 20 cm e em cativeiro com 10 a 17 cm de comprimento (LEONHARDT, 1997) e estão aptas à reprodução a partir de 30g de peso médio (GRAAF; GALEMONI; HUISMAN, 1999). Estas características tornam a tilápia do Nilo um interessante modelo experimental para estudos morfofisiológicos da reprodução em diferentes condições de cultivo.

No Brasil, a tilápia nilótica está disseminada em todas as bacias hidrográficas e o seu cultivo em tanques-rede se intensificou em Minas Gerais, especialmente nos reservatórios hidrelétricos de Furnas e Três Marias, depois do Decreto n° 4.895 de 25 de novembro de 2003 que trata da

autorização do uso dos corpos d'água para fins da aquicultura (BRASIL, 2003). Apesar da carência de estudos científicos que avaliem os impactos do cultivo de tilápias em ambientes naturais, essa prática tem avançado para águas salobras e há relatos da invasão de tilápias em bacias hidrográficas costeiras e em água salgada (EL-SAYED; MOHARRAM, 2007; LOWE et al., 2012; PETERSON et al., 2004).

1.2 Tolerância de tilápias à salinidade

Apesar de serem peixes de água doce, acredita-se que as tilápias tenham ancestrais marinhos (MCANDREW, 2000) e, por isso, a maioria das espécies é capaz de tolerar uma grande faixa de salinidade da água, podendo crescer e reproduzir em águas salobras e, algumas espécies conseguem sobreviver em águas com salinidade superior a 30 g/L (EL-SAYED, 2006b). A taxa de mortalidade torna-se considerável a partir de 23 g/L, sendo atribuída ao estresse hiperosmótico, que torna o animal suscetível a enfermidades (EL-SAYED; MANSOUR; EZZAT, 2005; ERNST et al., 1991; FONTAÍNHAS-FERNANDES et al., 2002). Entretanto, a exposição precoce desde a desova e incubação dos ovos em salinidades elevadas pode favorecer a tolerância à salinidade em *O. niloticus* (WATANABE; KUO; HUANG, 1985a). A tolerância à salinidade depende principalmente da espécie, do tamanho, do tempo/método de aclimação e de fatores ambientais (EL-SAYED, 2006b), estando mais relacionada ao tamanho do corpo do que à idade cronológica (VILLEGAS, 1990; WATANABE; KUO; HUANG, 1985b). No entanto, ela não aumenta indefinidamente com o tamanho. *O. niloticus* atinge tolerância máxima à salinidade com 5,17 cm de comprimento corporal e o crescimento adicional não deve alterar sua tolerância (WATANABE; KUO; HUANG, 1985b). O crescimento geralmente aumenta com a temperatura, mas diminui quando a salinidade aumenta acima de 8 g/L, sendo a temperatura entre 28 e 32°C e a salinidade entre 0 e 8 g/L a combinação ideal. Juvenis de tilápia cultivados a 32°C e 16 g/L de salinidade desenvolveram lesões corporais próximas ao opérculo e ao pedúnculo caudal (LIKONGWE et al., 1996). De acordo com Payne and Collinson (1983), salinidades entre 5 e 10 g/L geram crescimento acelerado de *O. niloticus*.

O custo energético da regulação iônica é menor em um ambiente isotônico, onde os gradientes iônicos entre o sangue e a água são mínimos, e esta economia de energia é significativa para aumentar o crescimento (MORGAN; IWAMA, 1991). De acordo com esses autores, um ligeiro retardo de crescimento em água doce pode ser causado pelo gasto de energia para eliminação do excesso de água dos tecidos num ambiente hipotônico. A salinidade da água também afeta a reprodução da tilápia. O desenvolvimento gonadal e a desova ocorrem em salinidades baixas, mas a reprodução cessa completamente em salinidades acima de 30 g/L (FINEMAN-KALIO, 1988). Outro estudo relata que o número de desovas da tilápia do Nilo foi maior em água salobra (5-15 g/L) que na água de mar (32 g/L) ou água doce (WATANABE; KUO, 1985).

1.3 Testículos de teleósteos: anatomia e estrutura geral

Na maioria dos peixes teleósteos, os testículos são órgãos pares ligados dorsalmente à cavidade celômica pelo mesórquio, uma bainha fibrosa de tecido conjuntivo. Os testículos estão dispostos dorsalmente ao tubo digestivo e ventralmente aos rins, percorrendo longitudinalmente a cavidade celômica. Apresentam comprimento semelhante, podendo estar parcialmente ou totalmente fundidos, unindo-se caudalmente para formar o ducto comum, que se exterioriza através da papila urogenital (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL, 2009). Variações morfológicas em testículos (volume, coloração, irrigação sanguínea e turgidez) são comuns durante o ciclo reprodutivo (BAZZOLI, 2003).

Microscopicamente, os testículos são revestidos pela túnica albugínea, uma cápsula de tecido conjuntivo que emite septos para o interior do órgão, delimitando os compartimentos: intersticial (intertubular) e espermatogênico (tubular ou germinativo) (SCHULZ; NÓBREGA, 2011a). O compartimento intertubular contém células esteroideogênicas de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, macrófagos e mastócitos, células nervosas e tecido conjuntivo contínuo com a túnica albugínea, que envolve externamente o testículo (KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002). O compartimento tubular é delimitado por uma membrana basal e células peritubulares mióides e abriga o epitélio germinativo. Este epitélio contém apenas dois tipos de células, as células de Sertoli e as células germinativas, que são encontradas em diferentes estágios do desenvolvimento. *In vivo*, as células germinativas só podem sobreviver em interação estreita e contínua com as células de Sertoli, de modo que o número de células de Sertoli determina a capacidade espermatogênica de um testículo e é um alvo importante de sistemas de sinalização que regulam a espermatogênese (MATTA et al., 2002).

Nos vertebrados amniotas (répteis, aves, mamíferos) as células de Sertoli proliferam somente até a puberdade e suportam células germinativas em diferentes estádios do desenvolvimento (SCHULZ et al., 2010) (Fig. 1A). Nos vertebrados anamniotas (peixes e anfíbios), por outro lado, encontramos a espermatogênese do tipo cística (ENGEL; CALLARD, 1996). Existem duas diferenças principais em comparação aos testículos de vertebrados amniotas. Primeiro, dentro dos túbulos, as extensões citoplasmáticas das células de Sertoli formam cistos que envolvem um único grupo de células germinativas, clones e sincrônicas, que derivam de uma única espermatogônia (Fig. 1B). Em segundo lugar, as células de Sertoli mantêm sua capacidade de proliferar também em peixes adultos (SCHULZ et al., 2005). Assim, o cisto espermatogênico é a unidade funcional básica do epitélio germinativo em peixes, formado por um grupo de células de Sertoli que circundam e dão suporte a um clone de células germinativas em desenvolvimento sincrônico. O compartimento tubular dos testículos de peixes contém grupos de células

germinativas em diferentes estágios da espermatogênese (Fig. 1B). As células de Sertoli císticas podem ser mais eficientes no desenvolvimento de células germinativas, pois expressam fatores de crescimento necessários para cada fase do desenvolvimento, resultando em baixa porcentagem de apoptose de células germinativas e, conseqüentemente, alto rendimento espermatogênico. As células de Sertoli não císticas, pelo contrário, são mais diversificadas ou regionalizadas já que devem suprir diferentes clones de células germinativas ao mesmo tempo (SCHULZ et al., 2010).

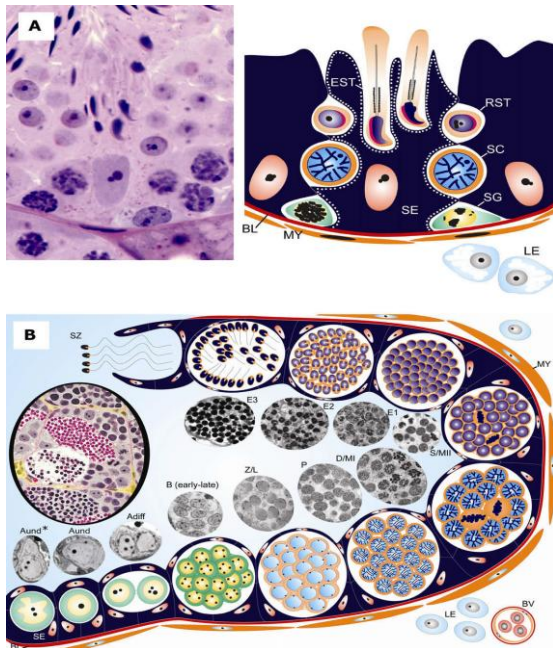


Figura 1- Comparação entre testículos de mamíferos (A) e de peixes (B). Segmentos de túbulos seminíferos mostram as diferenças na relação da célula de Sertoli com as células germinativas na espermatogênese cística (B) e não cística (A). O epitélio germinativo contém Sertoli (SE) e células germinativas, delimitado pela lâmina basal (BL) e células peritubulares mióides (MY). As células de Leydig (LE) e vasos sanguíneos (BV) são vistos no interstício. (A) espermatogônia (SG); espermtócito (SC); espermtíde arredondada (RST) e espermtíde alongada (EST). (B) espermatogônia tipo A indiferenciada (A_{und}); espermatogônias tipo A diferenciadas (A_{diff}); espermtogônias tipo B [B (early-late)]; espermatócitos primários em zigóteno/leptóteno (Z/L); espermatócitos primários em paquíteno (P); espermatócitos em diplóteno da metáfase I (D/MI); espermatócitos secundários/metáfase II (S/MII); espermtídes iniciais (E1), intermediárias (E2) e finais (E3); espermatozoides (SZ). (SCHULZ et al., 2010)

1.4 Ovários de teleósteos: anatomia e estrutura geral

Os ovários apresentam a mesma localização anatômica dos testículos e estão suspensos da parede dorsal do peritônio por um mesentério, o mesovário. Este tecido reveste o ovário e penetra em seu interior formando as lamelas ovulíferas. Cada lamela possui um epitélio germinativo e, internamente, o estroma do ovário. Entre ambos desenvolve-se uma lâmina basal que divide o ovário em dois compartimentos: epitelial e estroma. O epitélio germinativo é invadido por ovogônias que originarão os ovócitos. O estroma contém células somáticas gonadais, fibroblastos, granulócitos, fibras colágenas e vasos sanguíneos (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2009; LUBZENS et al., 2010).

1.5 Gametogênese

A base celular da reprodução em animais são gametas haploides. Enquanto um sexo produz um número relativamente pequeno de gametas grandes, ovos ricos em reservas, o outro produz um número muito maior de gametas pequenos, espermatozoides, que evoluíram como transportadores

do genoma móvel e são altamente especializados. Embora o desenvolvimento de ovos e espermatozoides mostre princípios comuns, muitos aspectos da gametogênese diferem entre os sexos (SCHULZ et al., 2010).

1.5.1 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo organizado e coordenado, no qual a espermatogônia diploide prolifera e se diferencia progressivamente para formar espermatozoides maduros. A duração deste processo geralmente é menor nos peixes que nos mamíferos e é influenciada pela temperatura da água (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009). O processo pode ser dividido em três fases morfofuncionais: a fase mitótica ou spermatogonial, com as diferentes gerações de espermatogônias (indiferenciadas, diferenciando e diferenciadas, incluindo células-tronco); a fase meiótica, com os espermatócitos primários e secundários; e a fase espermiogênica, com as espermatídes haploides diferenciando em espermatozoides (SCHULZ et al., 2010).

A espermatogônia tipo A indiferenciada (A_{und}) dá origem à espermatogônia de tipo A diferenciada (A_{diff}), que ainda compartilha algumas características morfológicas com A_{und} , mas com um potencial reduzido de auto-renovação. O compromisso irreversível com a maturação e mudanças em vários aspectos morfológicos dá origem à espermatogônia de tipo B que se divide mais rapidamente e geralmente possui várias gerações. O número de gerações varia entre espécies (ANDO et al., 2000) e é geneticamente determinado. Após a mitose final, a espermatogônia tipo B origina espermatócitos primários. Estes últimos sofrem a 1ª divisão meiótica originando os espermatócitos secundários que, através da 2ª divisão meiótica, dão origem às espermatídes. Estas diferenciam em espermatozoides (SCHULZ et al., 2010). Na espermiogênese, as espermatídes sofrem mudanças drásticas como condensação da cromatina, redução citoplasmática e desenvolvimento do flagelo, resultando nos espermatozoides (SIQUEIRA-SILVA et al., 2012). O final da espermiogênese é marcado pelo rompimento das pontes citoplasmáticas entre as espermatídes e pelo rompimento dos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli, liberando os espermatozoides no lume dos túbulos seminíferos (BATLOUNI; NÓBREGA; FRANÇA, 2009; SCHULZ; NÓBREGA, 2011a) (Fig. 2).

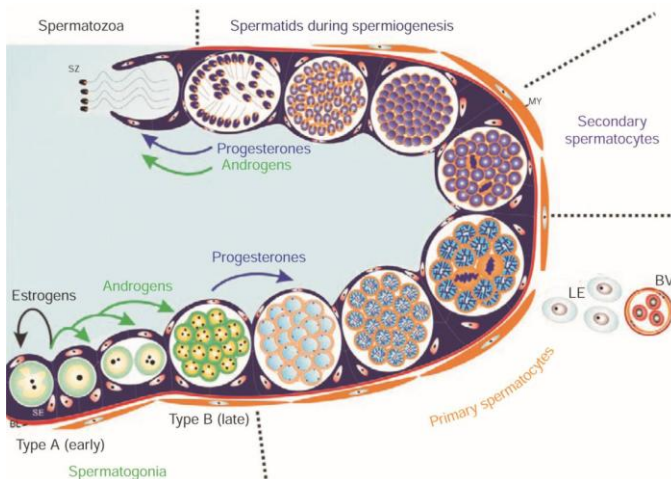


Figura 2- Componentes testiculares e atuação dos esteroides sexuais nas diferentes fases da espermatogênese. Células de Sertoli (Se); membrana basal (BL); células de Leydig (LE); vasos sanguíneos (BV); células mioídes (MY); espermatozoides (SZ) (SCHULZ; NÓBREGA, 2011b).

1.5.2 Ovogênese

Ovogênese é o processo pelo qual a ovogônia é transformada em ovócitos maduros prontos para serem ovulados (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2009; LUBZENS et al., 2010). A ovogônia se multiplica por divisão mitótica formando um agregado de células filhas (ninho de ovogônias) que são conectadas por pontes citoplasmáticas. Uma camada única de células somáticas pré-granulosas envolvem o ninho de células filhas. Cada ovogônia, então, se isola de outra ovogônia e entra na prófase da 1ª divisão meiótica, formando o ovócito primário envolto pela camada granulosa (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2009; LUBZENS et al., 2010; MENN; CERDÀ; BABIN, 2007). Neste momento, estão formados os folículos ovarianos, constituídos por ovócito, camada granulosa e teca, que são células somáticas externas à camada granulosa (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2009; MENN; CERDÀ; BABIN, 2007). A meiose é bloqueada em diplóteno da 1ª divisão meiótica até o início da maturação ovocitária, quando ocorre o reinício da meiose.

A principal característica do crescimento primário é a síntese de componentes que têm papéis importantes no desenvolvimento posterior do ovócito. Histologicamente, observa-se ooplasma basófilo, devido ao acúmulo de RNAs necessário para síntese proteica e de receptores para vitelogenina (Vtg), precursor do vitelo (BABIN et al., 2007). O núcleo, agora chamado de vesícula germinal, cresce e apresenta muitos nucléolos em sua periferia (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2009; MENN; CERDÀ; BABIN, 2007). Durante a fase perinucleolar, o ovócito e as células granulosa se separam. O ovócito emite microvilosidades para este espaço que é preenchido por uma matriz extracelular proteica, a zona pelúcida (MENN; CERDÀ; BABIN, 2007; MODIG; WESTERLUND; OLSSON, 2007). Em seguida, formam-se vesículas delimitadas por membrana, os alvéolos corticais (AC), cujo conteúdo é sintetizado no próprio ovócito, com participação do complexo de Golgi (WOOTTON; SMITH, 2015). Após a fertilização, ocorre

despolarização do ovócito, causando a liberação de Ca^{2+} em seu entorno, culminando com a liberação do conteúdo dos AC entre o oolema e a ZP, separando as duas estruturas e formando o espaço perivitelino. Alveolina e transglutaminase liberadas pelos AC no espaço perivitelino catalisam as reações das subunidades da ZP, enrijecendo-a e evitando a polispermia através do bloqueio do acesso de outros espermatozoides à superfície do ovo (WOOTTON; SMITH, 2015). Em algumas espécies, os AC preenchem a maior parte do citoplasma, enquanto em outras, ocupam a periferia (WOOTTON; SMITH, 2015). Outro componente citoplasmático que aparece nesta fase, principalmente em ovócitos de peixes marinhos e de seus descendentes de água doce, como a tilápia do Nilo, são as vesículas lipídicas. Estas armazenam o vitelo lipídico que servirá de nutriente para o embrião durante seu desenvolvimento (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2009). Estas são, provavelmente, derivadas de lipoproteínas de baixa densidade transportadas para os ovários na corrente sanguínea e absorvidas pelo folículo. Em algumas espécies, essas estruturas também podem contribuir para a flutuabilidade do ovo, devido à baixa densidade dos óleos (WOOTTON; SMITH, 2015).

O crescimento secundário do ovócito caracteriza-se pelo acúmulo de vitelo em glóbulos ou vesículas, recurso necessário para diferenciação e crescimento do embrião e larva (alimentação endógena). Nesta fase, o crescimento do ovócito é acelerado e há espessamento da ZP enquanto o ovócito continua em prófase meiótica. A Vtg é processada pelo ovócito e transformada em lipoproteína e fosfoproteínas que são armazenadas nos glóbulos ou vesículas de vitelo. A Vtg é uma glicofosfolipoproteína de alto peso molecular (300-640 kDa) sintetizada no fígado. Esta síntese é estimulada pelo estradiol-17 β (E2) produzido pelas células da granulosa dos folículos ovarianos. A Vtg é transportada pelo sangue do fígado para os ovários, deixa a corrente sanguínea, passa entre as células da teca e atravessa a lâmina basal, passando entre as células da granulosa e ao longo das microvilosidades dos ovócitos. Agora, na superfície do ovócito, a Vtg é capturada por seus receptores localizados em invaginações do oolema revestidas com clatrina ('coated pits'). Por endocitose, esta estrutura se desloca para a ooplasma, formando vesículas recobertas por clatrina que se fundem aos lisossomos. A Vtg é, então, quebrada e dividida em componentes do vitelo por clivagem proteolítica. Os lisossomos aumentam de tamanho, formam corpos multivesiculares e tornam-se pequenos glóbulos de vitelo e depois grandes glóbulos de vitelo (WOOTTON; SMITH, 2015). A densidade dos receptores de Vtg aumenta no oolema durante a vitelogênese devido a alta taxa de transferência de Vtg para o ovócito, mas essa densidade diminui antes da ovulação (TYLER; SUMPTER, 1996). A Vtg não é a única forma de nutrição que a fêmea transfere para seus ovos. Os microvilos dos ovócitos formam junções gap com os microvilos das células da granulosa, formando um canal aquoso contínuo que liga o citoplasma das duas células (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2009). Esses canais permitem a troca de íons e pequenas moléculas,

permitindo a transferência de fatores que regulam a vitelogênese e a maturação ovocitária (WOOTTON; SMITH, 2015). Neste período, o ovócito também acumula RNA (RNA materno) e completa a diferenciação de seus envoltórios celulares e não celulares. O crescimento secundário é a fase em que a massa dos ovários aumenta consideravelmente em relação à massa total do peixe, de modo que no final dessa fase os ovários representam mais de 20% da massa corporal em algumas espécies, uma alocação maciça de recursos do corpo somático para as gônadas (WOOTTON; SMITH, 2015).

A maturação final ovocitária é caracterizada por redução ou suspensão da endocitose, retomada da meiose, degradação da vesícula germinativa, formação de uma monocamada de AC sob o oolema e, nos peixes marinhos, dissolução de vesículas ou glóbulos de vitelo que leva à hidratação dos ovócitos pelágicos. A primeira divisão meiótica dá origem a duas células de tamanhos diferentes, a pequena (primeiro corpúsculo polar) degenera e o grande ovócito secundário é formado e, finalmente, a ovulação ocorre no final do processo de maturação (Fig. 3). O ovócito secundário é expulso das camadas de células foliculares circundantes e se move para dentro do lume ovariano, permanecendo em metafase II. A fertilização provoca o término da meiose II, dando origem ao óvulo haploide e formando o segundo corpúsculo polar que também degenera. Durante a fertilização, o núcleo do óvulo haploide se funde ao núcleo haploide do espermatozoide formando o ovo diploide (LUBZENS et al., 2010).

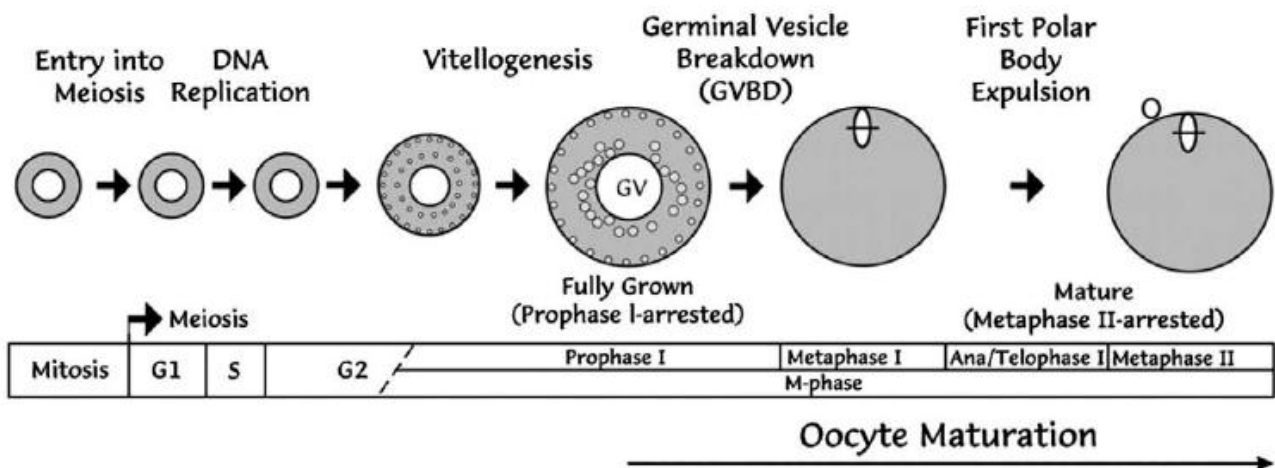


Figura 3- Desenvolvimento dos ovócitos em relação à meiose em peixes teleósteos (LUBZENS et al., 2010).

Na ovulação, somente o ovócito é liberado no lume ovariano, deixando para trás as células da granulosa e teca. O folículo perde sua forma como a saída do ovócito e seu lume se torna contínuo com o lume ovariano. Em mamíferos, a atividade endócrina do folículo pós-ovulatório é importante na manutenção da gravidez, o que não ocorre nos teleósteos ovíparos. A degeneração do

folículo pós-ovulatório deve-se à morte celular (denominada apoptose) (WOOTTON; SMITH, 2015).

Outra forma de atresia ocorre durante a ovogênese através da degeneração do folículo, incluindo o ovócito. Esta forma pode ocorrer em todas as etapas da ovogênese, sendo mais comum na fase vitelogênica. Além disso, folículos em que o ovócito não foi ovulado antes de desovar tornar-se atresícos. Durante a atresia pré-ovulatória, o núcleo do ovócito e as organelas se degeneram e a zona pelúcida começa a desintegrar. As células foliculares proliferam, hipertrofiam e fagocitam o ovócito. Assim que o ovócito é digerido, as células foliculares são fagocitadas por células do estroma do ovário. A atresia pré-ovulatória pode ser uma resposta a condições adversas, incluindo má nutrição, condições abióticas desfavoráveis e poluição (WOOTTON; SMITH, 2015).

1.6 Fisiologia da reprodução

Nos vertebrados, o cérebro não se comunica diretamente com as gônadas no controle da reprodução. O hipotálamo produz neuro-hormônios que estimulam células hipofisárias a produzirem hormônios que serão secretados na corrente sanguínea e transportados para as gônadas. Esta sequência de eventos é chamada de eixo reprodutivo hipotálamo-hipófise-gônada (WOOTTON; SMITH, 2015).

A hipófise, ao ser estimulada, produz o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Esses hormônios são transportados, via corrente sanguínea, até as células-alvo nas gônadas. Em seu destino, FSH e LH estimulam as células a produzirem hormônios esteroides, incluindo andrógenos, estrógenos e progestinas, que regulam os processos de ovogênese e espermatogênese (PLANAS; SWANSON, 2008). Outra função importante desses hormônios esteroides produzidos nas gônadas é fornecer informações ao cérebro sobre o estado das gônadas. Os esteroides têm efeitos de feedback positivo e negativo no eixo reprodutivo (WOOTTON; SMITH, 2015). Nas células esteroidogênicas, o primeiro passo na síntese de esteróides sexuais funcionais requer a transferência do colesterol do citoplasma para a membrana interna da mitocôndria. Após a transferência, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima P450. A pregnenolona atua como ponto de partida para várias vias esteroidogênicas e a enzima P450 é a chave nestas vias (PANKHURST, 2008; YOUNG et al., 2005).

Nos testículos, as células de Leydig são as principais células-alvo e sob a influência do FSH e LH, a pregnenolona é convertida em 17α -hidroxiprogesterona (17α P) (SCHULZ; NÓBREGA, 2011b). O 17α P, influenciado pelo FSH, transforma-se em testosterona (T) que serve como substrato para produção de 11-ketotestosterona (11-KT). T e 11-KT são responsáveis pela maturação testicular, atuando especialmente na divisão mitótica das espermatogônias e na espermição (HAIDER, 2007; OHTA et al., 2007; WAAL et al., 2009) (Fig. 4).

Nos ovários, as células da teca e da camada granulosa são as células alvo. As células tecais, sob a influência do FSH, convertem pregnenolona em T, que será convertida em E2 pelas células foliculares através da ação da enzima P450 aromatase (SENTHILKUMARAN; YOSHIKUNI; NAGAHAMA, 2004). E2 promove a proliferação mitótica das ovogônias e a vitelogênese (YARON; LEVAVI-SIVAN, 2011) e também participa na formação dos alvéolos corticais e das vesículas lipídicas (CAMPBELL et al., 2006). E2 é transportado para o fígado via corrente sanguínea e, nos hepatócitos, tem três efeitos principais. Em baixos níveis, estimula a síntese de seus receptores. A abundância destes, ligados a E2, estimula a produção de Vtg que é transportada para os ovários pela corrente sanguínea. O terceiro efeito de E2 é estimular a síntese das proteínas que irão formar a zona pelúcida. E2 também possui efeito de "feedback", atuando nas células E2-sensíveis no cérebro e hipófise, regulando o eixo reprodutivo (LUBZENS et al., 2010; PANKHURST, 2008). 17β , 20α dihidroxi-4-pregnen-3-one (17β - 20α DHP), sintetizado pelas células foliculares sob a influência do LH, promove o início da meiose das células germinativas e maturação ovocitária final (MIURA; HIGASHINO; MIURA, 2007; YARON; LEVAVI-SIVAN, 2011). Portanto, o FSH regula a secreção de E2 e a incorporação de Vtg nos ovócitos, aumentando seu diâmetro devido ao acúmulo de vitelo citoplasmático (YARON; LEVAVI-SIVAN, 2011) (Fig. 4).

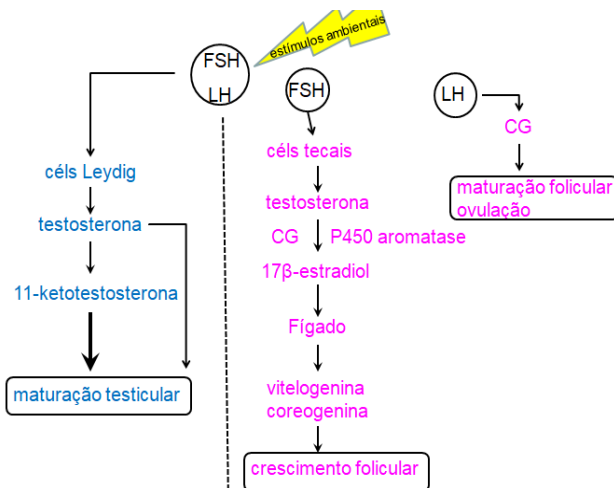


Figura 4- Atuação de hormônios na espermatogênese (azul) e na ovogênese (rosa). Hormônio folículo estimulante (FSH); hormônio luteinizante (LH); células da granulosa (CG).

1.7 Proliferação celular em gônadas

Os estudos que avaliam proliferação celular utilizam vários marcadores, como a timidina triciada, a bromodesoxiuridina (BrdU), o KI-67, o MCM7 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). O PCNA é uma proteína nuclear não-histônica bastante conservada entre as espécies e tem sido utilizada como um biomarcador de proliferação celular na gametogênese de peixes (CORRIERO et al., 2007; GUZMÁN et al., 2014; LOPPION et al., 2008; QUAGIO-

GRASSIOTTO et al., 2011). Esta proteína atua como cofator da DNA polimerase delta e está envolvida em importantes processos celulares, como replicação e reparo do DNA, controle do ciclo celular e sobrevivência da célula (BALLA et al., 2008; ESSERS et al., 2005; STOIMENOV; HELLEDAY, 2009).

Na maioria dos teleósteos o crescimento do testículo é contínuo, podendo acompanhar o aumento do peso corporal, sendo que a proliferação das células de Sertoli ocorre, geralmente, próxima a cistos de espermatogônias (KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002; SCHULZ et al., 2005; SCHULZ; MIURA, 2002). O arranjo cístico da espermatogênese em peixes permite que as células de Sertoli forneçam maior suporte às células germinativas, resultando em alta produção espermática, devido a disponibilidade de fatores regulatórios e a baixa apoptose (BATLOUNI; NÓBREGA; FRANÇA, 2009; NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009).

Durante o desenvolvimento ovariano, o balanço entre os sinais de proliferação e morte celular determinam o destino dos folículos ovarianos para ovulação ou para atresia (KRYSKO et al., 2008). A expressão de PCNA tem sido utilizada para avaliar a remodelação ovariana pós-desova em *O. niloticus* (MELO et al., 2015) e detectada nas células da teca de folículos atrésicos de *Prochilodus argenteus* e de *Leporinus taeniatus* (SANTOS et al., 2008).

1.8 Apoptose

A morte celular programada ou apoptose é um processo regulado geneticamente que ocorre nos tecidos visando a homeostase de organismos multicelulares (JENKINS; TIMMONS; MCCALL, 2013; KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Ela é caracterizada pela fragmentação do DNA e fragmentação celular em corpos apoptóticos, que são fagocitados por fagócitos ou células vizinhas, evitando, assim, reação inflamatória (BANGS; FRANC; WHITE, 2000; DRUMMOND et al., 2000). Os principais efetores da apoptose são as caspases (HUETTENBRENNER et al., 2003) e, entre elas, a caspase-3 é uma molécula efetora chave do programa apoptótico, sendo responsável pela clivagem proteolítica de várias proteínas celulares que levam a alterações morfológicas típicas da apoptose (BRENTNALL et al., 2013). A apoptose exerce papel essencial no desenvolvimento normal das células germinativas e pode ocorrer espontaneamente ou desencadeada por vários fatores, incluindo estímulos hormonais, estresse térmico e metais pesados (ANDREU-VIEYRA; BURET; HABIBI, 2005; SINHA HIKIM; SWERDLOFF, 1999).

O aumento da apoptose tem sido utilizado como biomarcador de impacto ambiental em peixes e a expressão de caspase-3 foi avaliada durante o desenvolvimento de células germinativas em testículos de peixes submetidos experimentalmente a diferentes estressores ambientais (ITO et al., 2003; MCCLUSKY et al., 2008; MIGLIARINI et al., 2005).

1.9 Indicadores de estresse: cortisol, lipídios e íons séricos e proteínas de choque térmico - HSPs

Peixes respondem ao estresse de forma específica e não específica; no entanto, as defesas não específicas ocorrem primeiro e são importantes na resistência do peixe ao estresse (BLAZER, 1991; YIN; LAM; SIN, 1995). O uso de parâmetros hematológicos como indicadores de estresse podem fornecer informações sobre as respostas fisiológicas dos peixes diante da mudança no ambiente externo (CASILLAS; SMITH, 1977). Dentre muitos parâmetros, os níveis séricos de cortisol são normalmente medidos para determinar a condição de estresse em peixes (RAMSAY et al., 2006). O aumento do estresse provoca aumento nos níveis deste esteroide (MARIEB; HOEHN, 2010; MARTINEZ-PORCHAS; MARTINEZ-CORDOVA; RAMOS-ENRIQUEZ, 2009), e este aumento pode ativar a sinalização do estresse oxidativo (OLSEN et al., 2008) e o metabolismo em teleósteos (SOENGAS; ALDEGUNDE, 2002). A resposta primária ao estresse inclui aumento da produção de catecolaminas e cortisol. As respostas secundárias são apresentadas nos parâmetros sanguíneos como perturbações à homeostase causadas pela liberação das catecolaminas e do cortisol (FOO; LAM, 1993; PICKERING, 1992). A resposta secundária altera os níveis séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol, refletindo mudanças na utilização da energia após o estresse (DI MARCO et al., 2008; RUANE; CARBALLO; KOMEN, 2002). As respostas hiperglicêmicas de plasma podem ser usadas como indicadores de estresse agudo e os lipídios plasmáticos como indicadores de estresse crônico (ALTAN et al., 2000; HSIEH; CHEN; KUO, 2003). Mudança de temperatura ou outros estressores ambientais afetam também a concentração de íons sanguíneos, tais como K^+ , Na^+ , Cl^- e Ca^{++} séricos em crustáceos (LIGNOT; SPANINGS-PIERROT; CHARMANTIER, 2000) e peixes tropicais (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002).

Os peixes são altamente suscetíveis às alterações ambientais e as proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins-HSPs) desempenham um papel central na homeostase celular e tecidual (MORIMOTO, 1998). As HSPs, conhecidas como proteínas de estresse, são um conjunto de proteínas altamente conservadas durante a evolução, possuem peso molecular variável (16-100 kDa) e são produzidas em todos os organismos celulares quando expostos a agentes estressores (ROBERTS et al., 2010). Elas são divididas em três famílias principais: HSP90 (85-90 kDa), HSP70 (68-73 kDa) e as de baixo peso molecular (16-47 kDa) (DAS; GUPTA; MANNA, 2005). Elas são constitutivamente expressas em condições normais e desempenham um papel crucial na regulação da apoptose. Dentre as HSPs, HSP27, HSP70 e HSP90 são consideradas anti-apoptóticas, uma vez que são capazes de se ligar a moléculas pró-apoptóticas, incluindo citocromo C e fator ativador de protease apoptótica (Apaf 1) (LI et al., 1997). Por outro lado, HSP10 e HSP60 são consideradas pró-apoptóticas (GUPTA; KNOWLTON, 2005).

A HSP70 é a mais estudada e alguns autores relatam uma correlação entre sua expressão e o aumento da apoptose em peixes submetidos experimentalmente a agentes tóxicos e a variações de temperatura (PORTER; JANZ, 2003; WEBER; JANZ, 2001). A relação entre HSP70, proliferação e apoptose é essencial para homeostase tecidual (KIM et al., 2006). Estudos com populações selvagens de *Prochilodus argenteus* da bacia do rio São Francisco indicaram que variações da HSP70 podem regular o balanço entre proliferação e morte celular dependente de caspase-3 das células espermatogênicas (DOMINGOS et al., 2013). Apesar de alguns estudos mostrarem uma relação entre HSP70 e os processos de proliferação e morte celular, a influência das variações da salinidade da água sobre esses parâmetros não foram ainda investigados.

2. JUSTIFICATIVA

A tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* é o terceiro peixe mais cultivado do mundo, atrás apenas do salmão e da carpa (MCGUIRE, 2017) e, devido à sua importância econômica, estudos relacionados à sua reprodução são cruciais para as culturas que dependem desse recurso para sua nutrição e economia. Além disso, a tilápia é um bom modelo para estudo dos efeitos provocados pelas mudanças climáticas e ambientais, pois é animal ectotérmico de água doce cujo habitat natural (rio costeiro) é suscetível ao aumento dos níveis oceânicos, expondo-a à intrusão de água salgada e à variação da temperatura (EL-RAEY, 1997).

A pequena quantidade de água doce em alguns países, a competição com a agricultura e com outras atividades urbanas aumentaram a pressão para desenvolver a aquicultura em água salobra e água do mar (EL-SAYED, 2006b). Apesar de não ser considerada a espécie mais tolerante à salinidade dentre as espécies de tilápia cultivadas, a tilápia do Nilo possui considerável potencial para o cultivo em água salobra, com baixa salinidade (STICKNEY, 1986; SURESH; LIN, 1992). Em geral, tilápias cultivadas nesses ambientes apresentam qualidade de carne superior à observada em animais mantidos em água doce. A água salgada e salobra minimizam os problemas de ‘*off-flavor*’, ou seja, a presença de sabores e odores indesejáveis, resultando em produtos atrativos quanto ao aspecto sensorial (KUBITZA; CAMPOS, 2005). Além disso, NaCl em baixas concentrações, é empregado na piscicultura para evitar o aparecimento de doenças em peixes pela eficiência na desinfecção e controle de alguns patógenos específicos (ALTINOK; GRIZZLE, 2001; GARCIA et al., 2007).

A maioria dos trabalhos publicados sobre o cultivo de tilápias em água salobra e água do mar abordam a tolerância e o crescimento de diferentes espécies e linhagens (JENNINGS; WILLIAMS, 1992; SURESH; LIN, 1992), mas os efeitos da salinidade sobre a gametogênese e maturação gonadal não foram ainda investigados em níveis celular e molecular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a influência da salinidade da água sobre a gametogênese da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* em condições de cultivo.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os níveis de HSP70, PCNA e caspase-3 em testículos de peixes nos diferentes tratamentos de salinidade e relacionar os dados obtidos com o IGS, proporção de células germinativas e concentrações plasmática de 11-KT;
- Determinar os níveis de HSP70, PCNA e caspase-3 em ovários e Vtg hepática e relacionar os dados obtidos com parâmetros reprodutivos e concentrações plasmáticas de E2 e cortisol nos diferentes tratamentos de salinidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Aquicultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (19°52'16''S, 43°58'14''W) em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil em agosto de 2013 (machos) e em maio de 2017 (fêmeas). A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, protocolo 396/2012) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil.

Para estudo da espermatogênese, um total de 94 machos adultos revertidos sexualmente com cerca de 60 g de peso corporal foram distribuídos aleatoriamente em 8 caixas plásticas com 150 L de água. Os peixes, 11 a 12/caixa, foram submetidos, em duplicatas, a quatro tratamentos de salinidade: (S0) água doce, (S7) 7 g/L, (S14) 14 g/L e (S21) 21 g/L de NaCl, correspondente a $0,09 \pm 0,01$ (S0), $7,10 \pm 0,06$ (S7), $14,06 \pm 0,01$ (S14) e $21,03 \pm 0,02$ (S21) g/L. Para evitar o acúmulo de amônia nas caixas, 2/3 da água foi sifonada diariamente e substituída por água de mesma temperatura e salinidade.

Para estudo da foliculogênese, um total de 48 fêmeas adultas com cerca de 400 g de peso corporal foram distribuídas aleatoriamente em 4 caixas plásticas com 800 L de água. As fêmeas, 12/caixa, foram submetidas aos mesmos tratamentos dos machos (S0 a S21). O experimento foi feito num sistema de recirculação com um filtro biológico/caixa, o que permitiu realizar a troca d'água apenas uma vez por semana.

Para salinizar a água, sal não iodado (Marisal Ltda, ingredientes: NaCl e anti-umectante INS 535 ferrocianeto de sódio) foi adicionado em 3 etapas de 7 g/L para aclimação, atingindo a concentração mais elevada após 9 h do início do tratamento. Durante os experimentos, as caixas foram mantidas com aeração contínua e fotoperíodo de 12L:12E. Os peixes foram alimentados com ração comercial (32% de proteína bruta) *ad libitum* duas vezes ao dia numa proporção de 2% da biomassa, e as sobras foram removidas após 30 min. Os parâmetros da água foram aferidos a cada 2 dias com sonda multiparâmetro YSI (Modelo 6920 V2) e as seguintes variações foram obtidas: temperatura entre 26 e 28°C, oxigênio dissolvido entre 5 e 7 mg/L e pH entre 6 e 7,2.

4.2 Amostragem dos peixes

No 1º experimento, a amostragem dos machos foi realizada com 1, 4 e 9 dias após início do tratamento e, no 2º experimento, as fêmeas foram amostradas com 1, 2 e 3 semanas. Os peixes foram eutanasiados por imersão em solução de eugenol a 285 mg/L e todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

De cada exemplar foram obtidos comprimento total (CT), peso corporal (PC) e peso das gônadas (PG). O peso dos fígados (PF) foi obtido somente das fêmeas. Por meio desses dados, foram calculados o índice gonadossomático ($IGS = 100PG/PC$), índice hepatossomático ($IHS = 100PF/PC$) e o fator de condição de Fulton ($K = 100PC/CT^3$).

Amostras de gônadas e fígado de fêmeas foram coletadas para análises microscópicas e moleculares. Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca para análise hormonal por ELISA.

4.3 Concentrações de íons e lipídios

A concentração de íons foi obtida através de eletrodo íon-seletivo (ISE): Na^+ em homogenatos de testículos (7 amostras por tratamento) e Na^+ , Cl^- e K^+ em plasma sanguíneo e homogenatos de ovários (8 a 14 amostras por tratamento). A dosagem de lipídios totais foi feita por espectrofotometria ultravioleta visível (UV-Vis) no plasma das fêmeas (9 a 15 amostras por tratamento).

4.4 Histologia e morfometria das gônadas

Para análise da gametogênese, fragmentos das gônadas de todos os exemplares foram fixados em líquidos de Bouin e Davidson por 12 h, conservados em álcool 70%, incluídos em parafina, seccionados com 5 μm de espessura, corados com hematoxilina-eosina e tricrômico de

Gomori e examinados ao microscópio de luz. Os diâmetros dos túbulos seminíferos (TS) foram obtidos considerando a média do maior e menor diâmetro, os quais foram medidos em 20 TS selecionados ao acaso por lâmina, usando objetiva de 10X. Nas fêmeas, os diâmetros dos ovócitos vitelogênicos (O4) foram medidos usando objetiva de 2,5X. As medidas, em ambos os casos, foram realizadas utilizando-se sistema de análise de imagem AxioVision acoplado a microscópio Axioplan Zeiss. Nos machos, a proporção (%) das células germinativas foi obtida aos 9 dias de tratamento, utilizando 6 peixes de cada salinidade. As células germinativas foram identificadas pelo diâmetro nuclear, organização da cromatina e desenvolvimento do nucléolo, seguindo critérios estabelecidos previamente (MELO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2017; SCHULZ et al., 2010). Espermatogônia tipo A, espermatogônia tipo B, espermatócito, espermátide, espermatozoide, célula de Leydig e tecido intersticial foram quantificadas em 5 campos aleatórios de cada corte histológico, com ampliação de 400X, totalizando 30 campos analisados por tratamento. O lume dos túbulos seminíferos e retração do tecido foram considerados espaços brancos nas contagens. Uma grade contendo 475 pontos de interseções entre linhas foi colocada sobre cada imagem para as contagens, sendo registrados os itens que estavam sob cada interseção, utilizando o programa ImageJ. Nas fêmeas, a proporção (%) dos folículos perinucleolares inicial (O1), perinucleolares avançado (O2), pré vitelogênicos (O3), vitelogênicos (O4) e folículos atrésicos (FA) foi obtida em 8 exemplares por tratamento. Os tipos de folículos foram identificados de acordo com (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2009).

4.5 Níveis hormonais no plasma sanguíneo

Nos machos, amostras de sangue (n = 6 a 10/salinidade) foram obtidas somente aos 9 dias de tratamento. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 800 rpm e o soro obtido foi congelado a -80°C. Níveis séricos de 11-KT foram determinados em duplicatas, utilizando 11-keto Testosterone ELISA Kit (Cayman Chemical). A reação cruzada de 11-KT com adrenosterona é < 3% e com T e outros andrógenos é < 0,01%. A sensibilidade do ensaio é de 1,3 pg/mL.

Em fêmeas, amostras de sangue (n = 10 a 15/salinidade) foram obtidas após 1, 2 e 3 semanas e processadas conforme descrito para machos. Os níveis séricos E2 e cortisol foram determinados utilizando ELISA Kit (Cayman Chemical e DRG Diagnostics, respectivamente). A reação cruzada de E2 com outros compostos é < 12% (estrone) e < 0,3% (outros compostos), com a sensibilidade do ensaio sendo de 15 pg/mL. As reações cruzadas de cortisol foram < 45% (corticosterona), < 9% (progesterona) e < 2,0% (outros compostos) e a sensibilidade do ensaio é de 2,5 ng/mL. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Imunolocalização de PCNA e caspase-3 nos testículos

Secções de testículos com 5 µm de espessura foram submetidas à reação de imunohistoquímica para a detecção de PCNA (anticorpo monoclonal de camundongo, clone PC-10, Sigma-Aldrich, USA) e caspase-3 (anticorpo policlonal de coelho, Sigma-Aldrich, USA). Para a reativação antigênica utilizou-se tampão citrato pH 6,0 aquecido em 5 etapas de 5 min no microondas. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com albumina sérica bovina (BSA) 2% em PBS durante 1h. Em seguida, os anticorpos primários (1:100) foram aplicados sobre os cortes e permaneceram “overnight” a 4°C. Para detecção da imunofluorescência usaram-se anticorpos secundários (1:500) Alexa Fluor 568 de cabra anti-camundongo (Invitrogen, Molecular Probes) e Alexa Fluor 488 de cabra anti-coelho (Invitrogen, Molecular Probes), respectivamente. A marcação do DNA nuclear foi feita com 4,6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI; 1:500). Para o controle negativo, omitiu-se o anticorpo primário. Os cortes foram analisados com microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da Universidade Federal de Minas Gerais (CAPI-UFMG).

4.7 Ensaios de ELISA para HSP70, PCNA e vitelogenina

Amostras de testículos (n = 6 a 10/salinidade), ovários (n = 9 a 14/salinidade) e fígado de fêmeas (n = 10 a 14/salinidade) previamente congeladas a -80°C foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração (50mM de Tris-HCl pH 8,0 com 0,02% de aprotinina e 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil 1mM), utilizando triturador/homogeneizador (TE-099 – Tecnal, Brasil) a uma razão de 1: 2 (peso de tecido: volume do tampão). Em seguida, os extratos foram centrifugados (Centrifuga 5804 R – Eppendorf) a 15.000 g durante 1h a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a -80°C para as análises. O total de proteínas solúveis em cada amostra foi determinado pelo método de Bradford, utilizando BSA como padrão (BRADFORD, 1976). Em seguida, as amostras (100 µg/µl) em duplicata foram incubadas durante 1 h em microplaca de 96 poços (Nunc, Dinamarca), bloqueadas com BSA a 2% por 45 min e incubadas novamente a 37 °C durante 1 h com anticorpo primário (monoclonal de camundongo anti-HSP70 clone BRM-22, monoclonal de camundongo anti- PCNA clone PC10, ambos da Sigma-Aldrich, USA, e policlonal de coelho anti-salmon Vtg, Biosense Laboratories AS, Norway), na diluição de 1:500. Após lavagem com PBS-Tween 0,05%, as placas foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho, Sigma-Aldrich, USA, na diluição de 1:1000) marcados com peroxidase durante 2h a 37° C. Após lavagens, a reação foi revelada com 200 µl de o-fenilenodiamina dicloridrato (OPD) 0,04% (Sigma-Aldrich, USA) em tampão fosfato-citrato 0,05 M com peróxido de hidrogênio a 0,0025%. A reação foi bloqueada pela adição de 50µl de H₂SO₄ a 5% em cada poço e a absorbância foi medida

a 492 nm utilizando um leitor de microplacas (Biotek Instruments, USA). Para validação dos ensaios de ELISA, curvas de diluição foram feitas com homogenatos dos tecidos (Fig. Suplementar).

4.8 Teste colorimétrico para caspase-3

A atividade enzimática da caspase-3 foi avaliada utilizando Caspase-3 Colorimetric Assay (R&D Systems, USA). Amostras de testículos ($n = 6/\text{salinidade}$) coletadas aos 9 dias de tratamento e ovários ($n = 9$ a $14/\text{salinidade}$), foram pesadas e trituradas em tampão de lise com inibidores de protease. Os homogenatos foram centrifugados a 15.000 g por 1 h a $4\text{ }^\circ\text{C}$ e o sobrenadante obtido foi incubado com o substrato para caspase-3 (DEVD-pNA) por 2 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$. A absorbância de cada amostra foi registrada a 405 nm e o nível da atividade da caspase-3 foi diretamente proporcional à cor da reação.

4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados no software BioEstat 5.3, expressos em média \pm erro padrão e considerados significativos com $p < 0,05$. Teste de Lilliefors foi usado para verificar a normalidade dos dados. ANOVA one way e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparar os valores de IGS, concentrações de íons e lípidos, 11-KT, E2, PCNA e Vtg entre os tratamentos. Análise de variância Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn foram utilizados para comparar as variáveis não paramétricas: IHS, K, diâmetro dos túbulos seminíferos, diâmetro dos folículos vitelogênicos, proporção das células espermatogênicas e dos folículos ovarianos, níveis testiculares e ovarianos de HSP70, caspase-3 e níveis plasmáticos de cortisol.

5. RESULTADOS

5.1 Biometria e índices biológicos

Os machos de *O. niloticus* apresentaram $14,19 \pm 0,22\text{ cm}$ de comprimento total, $58,94 \pm 2,64\text{ g}$ de peso corporal e $0,25 \pm 0,02\text{ g}$ de peso gonadal. Em relação às fêmeas, todos os exemplares de S21 morreram no dia seguinte ao início do tratamento com sal e o experimento prosseguiu com os grupos S0, S7 e S14. As fêmeas apresentaram $26,8 \pm 2,7\text{ cm}$ de comprimento total, $398,5 \pm 128,5\text{ g}$ de peso corporal e $16,7 \pm 11,6\text{ g}$ de peso gonadal. Em ambos os sexos, não houve variação significativa do IGS, IHS e K entre os tratamentos em cada tempo de coleta e nem variação temporal destes índices para cada salinidade, por isso; os dados dos três tempos de coleta foram agrupados para expressar melhor as diferenças entre as salinidades.

5.2 Concentrações de íons e lipídios

A concentração testicular de Na^+ apresentou aumento gradual de S0 a S21, mas sem diferença estatística entre os tratamentos ($F = 0,07$, $p = 0,97$). Nas fêmeas, a concentração plasmática de Na^+ foi significativamente maior em S14 em relação a S0 e S7 ($F = 22,69$, $p < 0,0001$) enquanto os valores de K^+ não apresentaram variação significativa ($F = 0,32$, $p = 0,73$). Nos ovários, não houve variação significativa na concentração dos íons Na^+ ($F = 0,03$, $p = 0,97$), K^+ ($F = 0,37$, $p = 0,70$) e Cl^- ($F = 1,66$, $p = 0,24$) entre os tratamentos. Os níveis de lipídios totais no plasma das fêmeas foi significativamente menor em S14 em relação a S0 e S7 ($F = 5,37$, $p = 0,009$) (Tabela 1).

5.3 Histofisiologia gonadal e gametogênese

Para machos, os valores de IGS foram significativamente maiores em peixes do grupo S0 ($0,59 \pm 0,09$) quando comparados aos grupos S14 e S21 ($0,33 \pm 0,04$ e $0,33 \pm 0,06$) ($F = 3,82$, $p = 0,013$), e não houve diferença significativa entre S0 e S7 (Fig. 6A). O fator de condição de Fulton (K) não apresentou variações significativas entre os tratamentos ($H = 4,61$, $p = 0,20$) (Fig. 6B). Os diâmetros dos túbulos seminíferos foram significativamente maiores em peixes de S0 $109,8 \pm 1,4 \mu\text{m}$ ($H = 30,06$, $p < 0,0001$) e não houve diferença significativa entre S7, S14 e S21 (Fig. 6D).

Nas fêmeas, observaram-se valores de IGS superiores no grupo controle (S0) em comparação a S7 e S14, mas sem diferença significativa ($F = 2,67$, $p = 0,08$) (Fig. 7A). Quanto ao IHS, seus valores foram significativamente menores em S14 em comparação a S0 e S7 ($H = 9,69$, $p = 0,008$) (Fig. 7B) e os valores de K foram significativamente menores em S7 e S14 quando comparados a S0 ($H = 6,23$, $p = 0,04$) (Fig. 7C). O diâmetro dos folículos vitelogênicos foi significativamente maior em S14 quando comparados a S0 e S7 ($H = 20,30$, $p < 0,0001$), não havendo variação significativa entre S0 e S7 (Tabela 2).

A análise histológica (Fig. 8 A-E) mostrou todos os machos em atividade espermatogênica, com cistos em maturação em todas as salinidades e períodos de coleta. Cistos de espermatócitos foram predominantes na maioria das amostras enquanto espermatides e espermatozoides foram menos numerosos. Em S0 e S7 os túbulos seminíferos apresentaram cistos preenchidos com células germinativas e tecido intersticial com células de Leydig evidentes na maioria das amostras (Figs. 8A e 8C). Nas fêmeas, todos os exemplares apresentaram ovários em maturação, com folículos vitelogênicos em todas as salinidades e períodos de coleta, além de folículos com vesículas corticais, perinucleolares e atrésicos (Fig. 9 A-D). Alterações histopatológicas foram observadas em machos submetidos a salinidades mais elevadas (S14 e S21): presença de cistos vazios nos túbulos seminíferos (Fig. 8B), aumento do tecido intersticial (Fig. 8D e 8E), hiperplasia e hipertrofia de

células de Leydig em algumas regiões (Fig. 8D). A presença de infiltrado inflamatório e granulócitos também foi observada em machos de S21 (Fig. 8E) e em fêmeas de S14 (Fig. 9E). Folículos vitelogênicos deficientes em vitelo foram observados em S14 (Fig. 9F).

Espermatogônias do tipo A e B apareceram em menor proporção (G_A e G_B) em todos os tratamentos, representando menos que 2% da proporção testicular. Espermatócitos (C) foram as células mais abundantes em todos os tratamentos, representando mais de 50% da proporção testicular. Espermátides (T) representaram aproximadamente 20% da proporção testicular, com diferença significativa entre S0 (maior) e S14 (menor) ($p < 0,05$). Espermatozoides (Z) foram menos numerosos nas salinidades mais altas, com diferença significativa entre S7 e S14 ($H = 8,82$, $p = 0,03$). A maior proporção de células de Leydig (L) foi observada em S14 e S21, com diferença significativa entre S7 e S14 ($H = 9,01$, $p = 0,03$). Espaços brancos (W) do lume tubular e retração do tecido foram similares nos 4 tratamentos ($p > 0,05$) e a proporção do tecido intersticial (I) foi significativamente maior em S14 em relação aos outros tratamentos ($H = 44,37$, $p < 0,0001$) (Fig. 6C).

Nas fêmeas, assim como ocorreu para o IGS, não houve variação significativa na proporção dos folículos ovarianos entre os tratamentos em cada período de coleta e nem com as coletas agrupadas. Como esperado, folículos perinucleolares avançados foram mais frequentes, representando mais de 40% da proporção folicular, sendo seguidos pelos folículos perinucleolares iniciais e folículos vitelogênicos enquanto os folículos com vesículas corticais foram os menos frequentes. Folículos atresícos foram pouco frequentes, representando menos de 10 % da proporção de folículos em todos os exemplares e sem diferença significativa entre tratamentos (Tabela 2). Folículos pos-ovulatórios foram eventualmente observados e por isso não foram quantificados.

Nos machos, as concentrações plasmáticas de 11-KT variaram de 92 a 135 pg/mL e foram maiores em S14 e S21, mas sem diferença significativa entre os tratamentos ($F = 1,62$, $p = 0,20$) (Fig. 6E). Nas fêmeas, os níveis séricos de E2 variaram entre 2,6 e 277,2 ng/mL e não houve diferença significativa entre os tratamentos ($F = 1,35$, $p = 0,28$), apresentando a maior média em S7 ($97,2 \pm 41,6$ ng/mL) e a menor em S14 ($43,7 \pm 11,4$) (Fig. 7D). As concentrações plasmáticas de cortisol variaram entre 2,5 e 212,5 ng/mL, com valores significativamente mais elevados em S14 quando comparados a S0 e S7 ($H = 11,17$, $p = 0,0037$) (Fig. 7E). Não foram realizadas dosagens de cortisol em machos.

5.4 HSP70, PCNA e caspase-3 ativa nas gônadas

Ensaio de ELISA foi realizado para investigar o efeito da salinidade sobre a expressão de HSP70. Nos machos, maiores níveis de HSP70 ocorreram no dia 1 para os 4 tratamentos. Diminuição significativa foi observada nos dias 4 e 9 em S14 e S21 ($H = 24,60$, $p < 0,0001$ e $H =$

14,29, $p = 0,0008$). Em S0 e S7 os níveis de HSP70 foram similares nos dias 1 e 4 e reduziram aos 9 dias de tratamento (Fig. 10A). Nas fêmeas, observou-se variação significativa nos níveis de HSP70 apenas com 1 semana de tratamento, quando peixes de S14 apresentaram menores valores que S0 e S7 ($F = 10,09$, $p = 0,001$). Analisando a variação temporal em S14, observou-se aumento gradual; porém, não significativo ($F = 2,60$, $p = 0,09$) dos níveis de expressão da HSP70 da 1ª para a 3ª semana de tratamento (Fig. 11A).

Comparando a expressão testicular de HSP70, PCNA e caspase-3 pelo ensaio de ELISA aos 9 dias de tratamento, os valores de HSP70 foram significativamente maiores em S21 em relação a S0 e S7 ($H = 16,70$, $p = 0,0008$). Por outro lado, os níveis de PCNA reduziram com o aumento da salinidade da água ($F = 7,36$, $p = 0,0007$) (Fig. 10B), enquanto a expressão da caspase-3 aumentou ($H = 11,77$, $p = 0,008$) (Fig. 10C). Nas fêmeas, quando analisamos a expressão de PCNA e caspase-3 com três semanas de tratamento, observam-se valores significativamente maiores de PCNA ($F = 3,68$, $p = 0,041$) (Fig. 11B) e significativamente menores de caspase-3 ($F = 5,77$, $p = 0,012$) em S7 em relação a S0 e S14 (Fig. 11C) enquanto os níveis de expressão da HSP70 não apresentaram variações significativas entre tratamentos (Fig. 11A).

As marcações para PCNA ocorreram principalmente em cistos de espermatogônias (Fig. 8F). A marcação para caspase-3 ocorreu em cistos de espermátides e espermatozoides (Fig. 8G).

5.5 Níveis hepáticos de vitelogenina

Valores significativamente mais baixos dessa proteína foram registrados em S14 em relação a S0 e S7 na 2ª semana de tratamento ($F = 33,67$, $p < 0,0001$) e em S14 em relação a S0 na 3ª semana de tratamento ($F = 4,85$, $p = 0,018$). Ausência de diferença estatística entre os tratamentos ocorreu na 1ª semana de tratamento ($F = 2,58$, $p = 0,098$) (Fig. 12).

Tabela 1. Concentração dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- (mEq/L) e de lípidos totais (mg/dL) em homogenatos de testículos, ovários e plasma sanguíneo de *O. niloticus* nos diferentes tratamentos.

Testículos	S0	S7	S14	S21
Na^+	$24,4 \pm 1,6^a$	$24,6 \pm 3,1^a$	$25,4 \pm 2,1^a$	$25,7 \pm 1,9^a$
Ovários				-
Na^+	$18,9 \pm 1,6^a$	$19,4 \pm 2,2^a$	$18,8 \pm 1,2^a$	-
K^+	$13,3 \pm 0,8^a$	$14,6 \pm 1,3^a$	$13,6 \pm 1,1^a$	-
Cl^-	$171,4 \pm 13,7^a$	$156,6 \pm 12,7^a$	$128,0 \pm 13,0^a$	-
Sangue - fêmeas				-
Na^+	$179,0 \pm 1,6^b$	$177,9 \pm 1,3^b$	$194,8 \pm 2,6^a$	-
K^+	$2,5 \pm 0,2^a$	$2,8 \pm 0,3^a$	$2,7 \pm 0,2^a$	-
Lípidos totais	$881,8 \pm 59,0^a$	$852,8 \pm 81,5^a$	$608,1 \pm 57,0^b$	

Valores expressos em médias \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tabela 2. Diâmetro médio de ovócitos vitelogênicos e proporção (%) de folículos em ovários de *O. niloticus* nos diferentes tratamentos.

Ovogênese	S0	S7	S14
Diâmetro folículo vitelogênico (μm)	$1279,2 \pm 32,4^b$	$1164,1 \pm 47,1^b$	$1428,9 \pm 35,5^a$
Folículo perinucleolar inicial (%)	$24,8 \pm 2,3^a$	$25,8 \pm 3,2^a$	$27,8 \pm 2,1^a$
Folículo perinucleolar avançado (%)	$42,3 \pm 5,0^a$	$41,5 \pm 5,0^a$	$45,0 \pm 2,7^a$
Folículo com vesículas corticais (%)	$7,6 \pm 1,7^a$	$11,6 \pm 3,6^a$	$7,7 \pm 1,4^a$
Folículo vitelogênico (%)	$16,6 \pm 3,0^a$	$18,4 \pm 4,0^a$	$13,7 \pm 1,7^a$
Folículo atrésico (%)	$8,8 \pm 2,6^a$	$2,7 \pm 0,2^a$	$5,8 \pm 1,7^a$

Valores expressos em médias \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

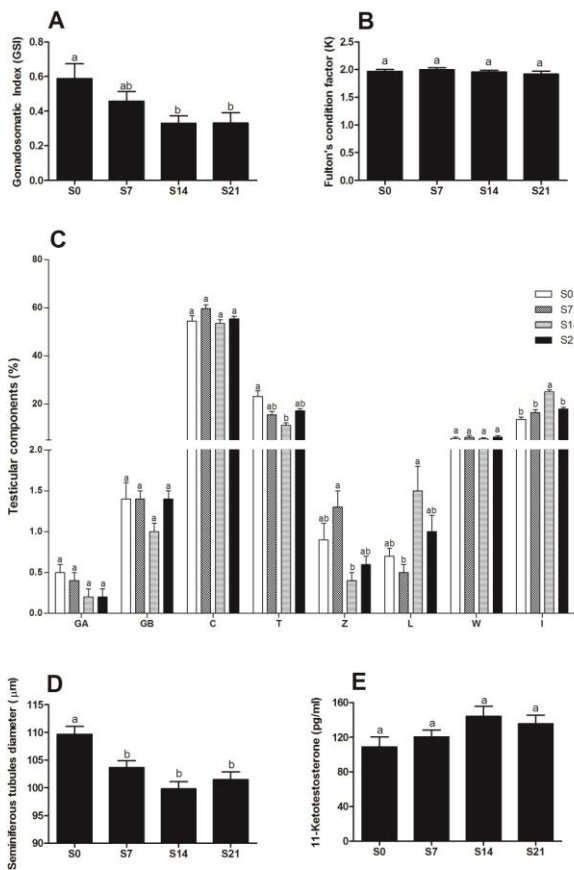


Figura 5- Machos: A- índice gonadosomático, B- fator de condição de Fulton, C- proporção dos componentes testiculares, D- diâmetro dos túbulos seminíferos e E- concentrações plasmáticas de 11-ketotestosterona. Valores expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

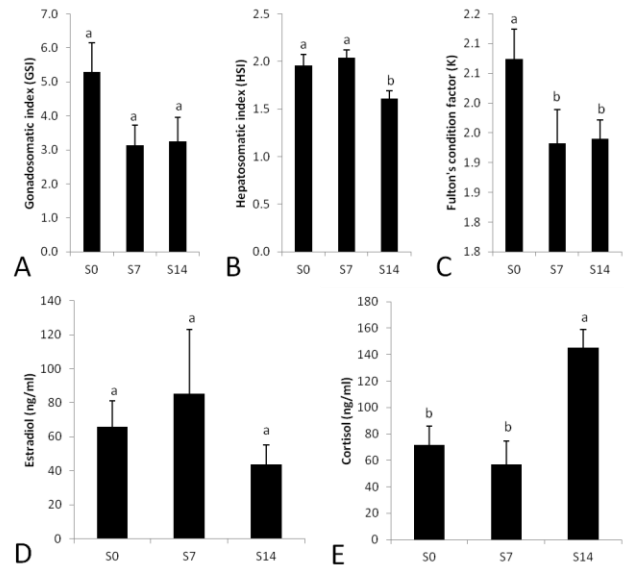


Figura 6- Fêmeas: A- índice gonadosomático, B- índice hepatossomático, C- fator de condição de Fulton, D- concentrações plasmáticas de estradiol e E- concentrações plasmáticas de cortisol. Valores expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

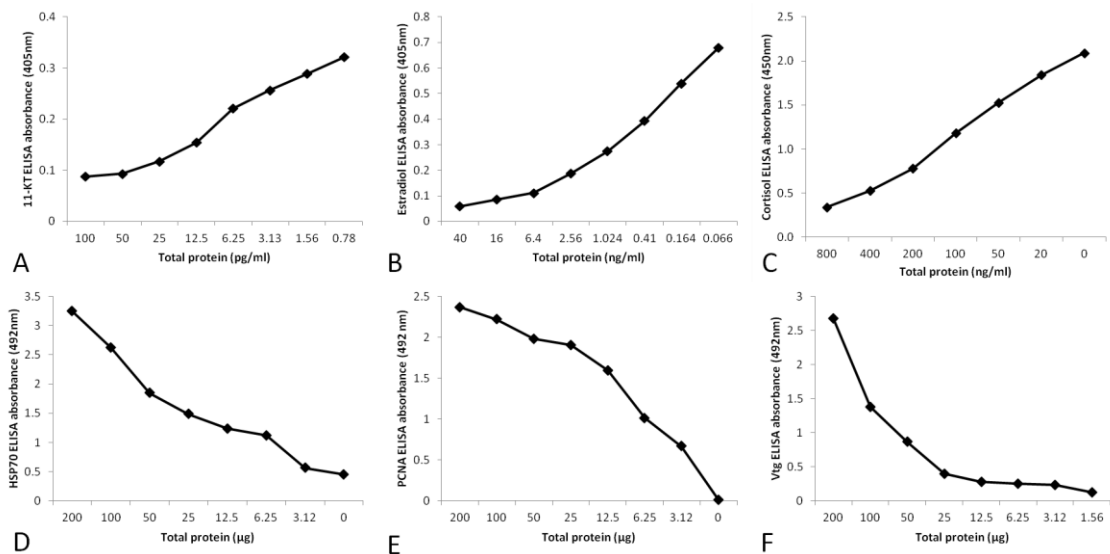


Figura suplementar 1- Curvas de diluição padrão: A- 11-ketotestosterona, B- 17β-estradiol, C- Cortisol. ELISA indireto em homogenatos de testículo, ovário e fígado para: D- HSP70, E- PCNA e F- Vitelogenina.

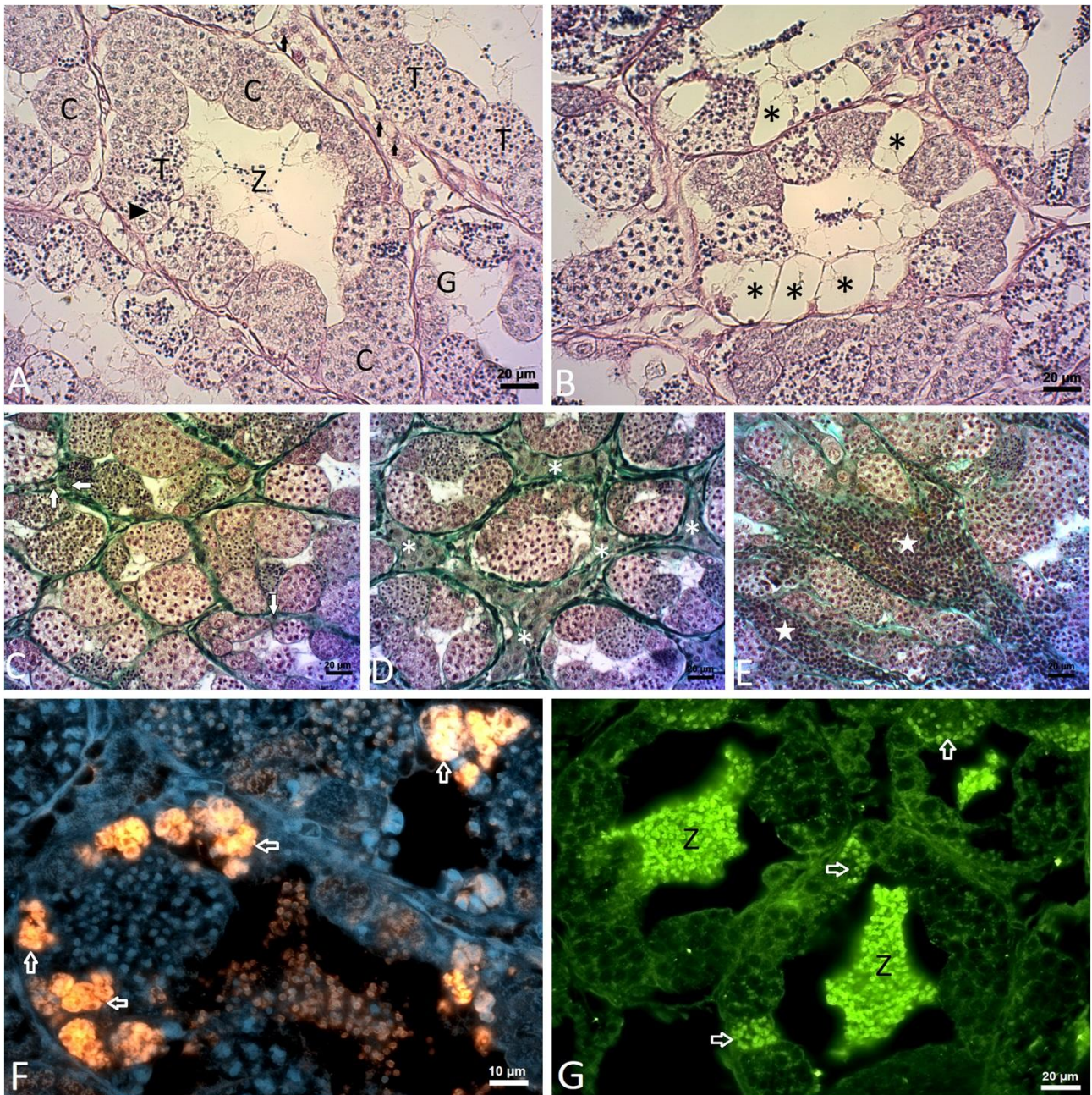


Figura 7- Secções histológicas de testículos de *O. niloticus*. A e B- Hematoxilina-eosina, C, D e E- Tricômico de Gomori, F e G- Reação imunohistoquímica para PCNA (F) e caspase-3 (G). A- Cistos preenchidos por: espermatogônia A (G), espermatogônia B (cabeça de seta), espermatócito (C), espermátide (T), espermatozoide (Z) no lume e células de Leydig (setas) no tecido intersticial em exemplar de S0. B- Cistos vazios (*) em exemplar de S21 (HE, 400x). C- Tecido intersticial delgado com poucas células de Leydig (setas) em exemplar de S7. D e E- Alterações em exemplares de S14: Hiperplasia e hipertrofia de células de Leydig (*) (D), e infiltrado inflamatório (estrelas) (E). F- Cistos de espermatogônias marcadas para PCNA (setas). G- Cistos de espermátides (setas) e espermatozoides (Z) marcados para caspase-3 em exemplares de S21.

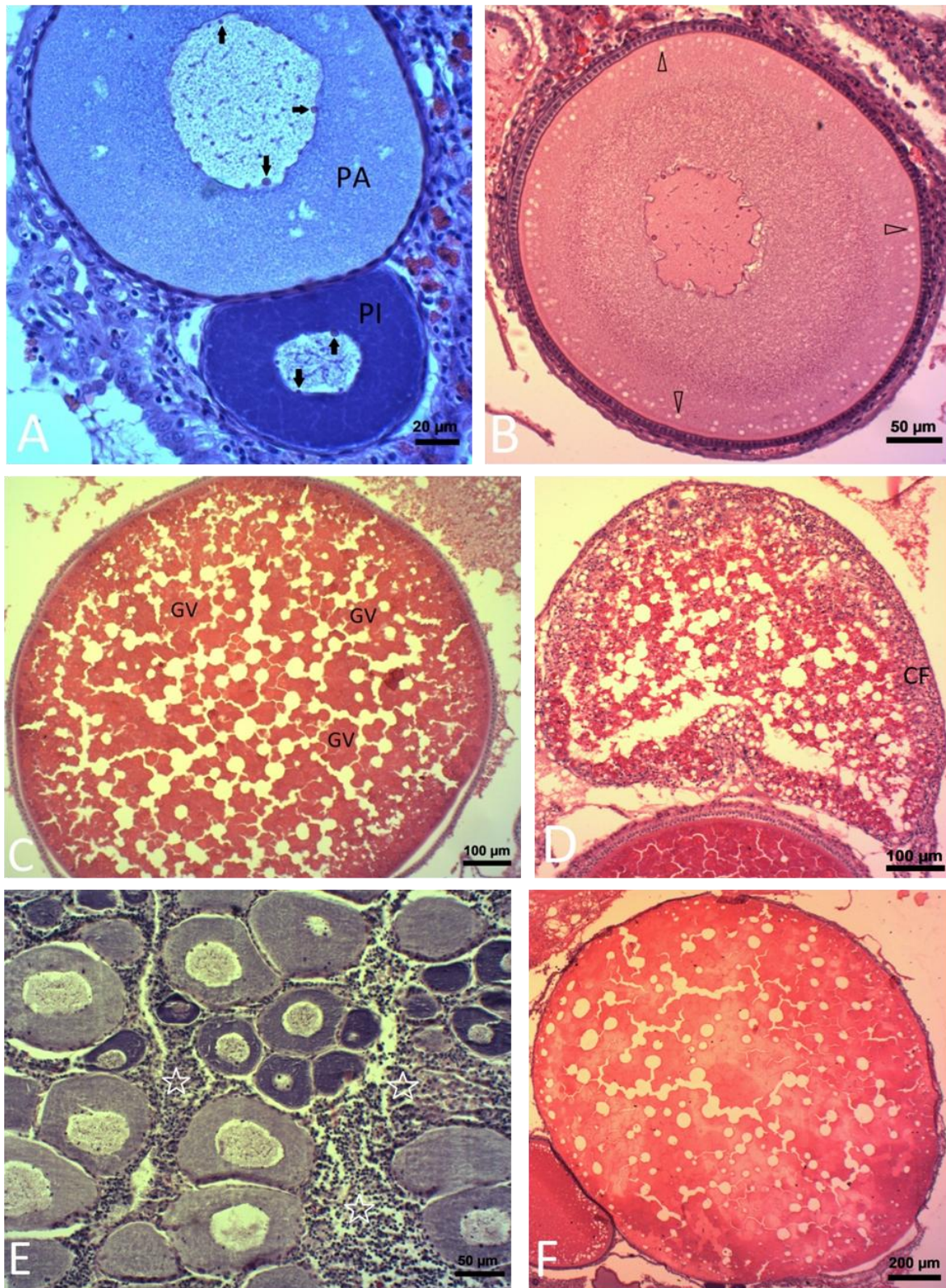


Figura 8- Secções histológicas de ovários de *O. niloticus* corados com hematoxilina-eosina. A- Folículo perinucleolar inicial (PI) com ooplasma basófilo e folículo perinucleolar avançado (PA), ambos com nucléolos (setas) na periferia nuclear (400X). B- Folículo com vesículas corticais periféricas (cabeças de seta) (200X). C- Folículo vitelogênico com ooplasma acidófilo devido à grande quantidade de glóbulos de vitelo (GV) (100X). D- Folículo atrésico com células foliculares hipertrofiadas (CF) que englobam gradativamente o vitelo em degeneração (100X). E- Infiltrado inflamatório com presença de granulócitos no interstício (estrelas) entre folículos perinucleolares (200X). F- Ovócito deficiente de vitelo (50X).

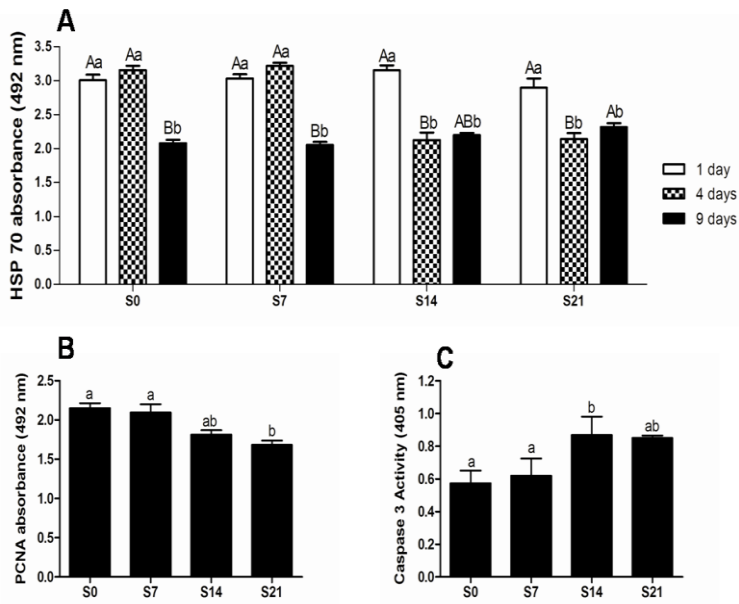


Figura 9- Variações testiculares de A- HSP70, B- PCNA e C- caspase-3. Valores expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa: letras maiúsculas - entre períodos de coleta e letras minúsculas - entre tratamentos.

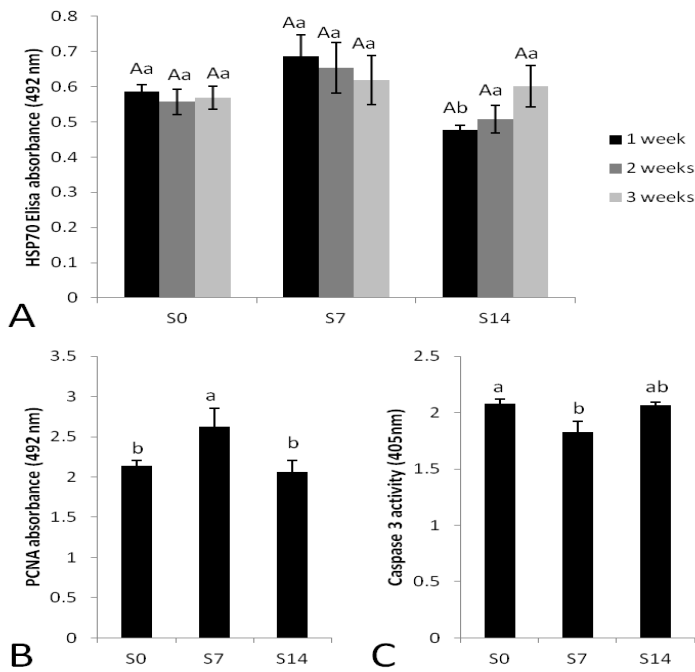


Figura 10- Variações ovarianas de A- HSP70, B- PCNA e C- caspase-3. Valores expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa: letras maiúsculas - entre períodos de coleta e letras minúsculas - entre tratamentos.

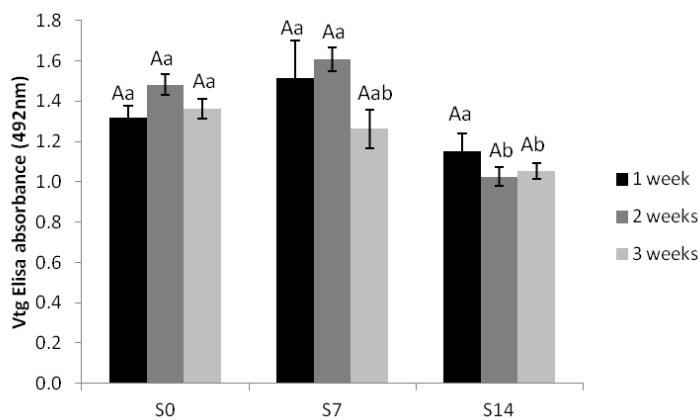


Figura 11- Variações hepáticas de vitelogenina (Vtg). Valores expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa: letras maiúsculas - entre períodos de coleta e letras minúsculas - entre tratamentos.

6. DISCUSSÃO

Devido à plasticidade de algumas estratégias de vida e o escape dos sistemas de produção em ambientes neotropicais, a tilápia do Nilo tem invadido diversos ecossistemas, representando uma ameaça à conservação da ictiofauna nativa devido a competição por alimento e espaço (CANONICO et al., 2005). Desta forma, estudos dos efeitos da salinidade da água sobre a biologia da reprodução de peixes são necessários visando a conservação da ictiofauna nativa neotropical. Nesse sentido, o presente estudo investigou a influência da salinidade da água sobre a gametogênese e expressão proteica de HSP70, PCNA e caspase-3 em gônadas da tilápia do Nilo em condições de cultivo. As tilápias são espécies eurialinas que têm ancestrais marinhos (MCANDREW, 2000); por isso, elas são capazes de tolerar uma ampla faixa de salinidade da água, podendo crescer e reproduzir em águas salobras (EL-SAYED, 2006b). Por esses motivos, constituem-se bons modelos para estudos experimentais. A tolerância à salinidade varia entre as espécies, sendo *O. niloticus* menos tolerante que outras espécies de tilápias como *O. mossambicus*, *O. aureus* e *Tilapia zilli* (EL-SAYED, 2006b).

No presente estudo, o fato de as fêmeas de S21 terem morrido algumas horas após aclimação ao sal, mesmo sendo bem maiores que os machos (~6 vezes mais pesadas) e os machos terem sobrevivido ao mesmo tratamento, confirma as afirmações da literatura que fêmeas são menos resistentes à salinidade (WATANABE; KUO; HUANG, 1985b). Estas diferenças podem ser relacionadas ao maior investimento das fêmeas na reprodução. Considerando que o aumento gradual de 5 g/L de sal por dia é o recomendado para aclimação de tilápias em águas hipersalinas, e o limite superior de segurança para a transferência direta é em torno de 18 g/L (SURESH; LIN, 1992), o curto prazo de apenas 9 h de aclimação entre água doce e 21g/L foi insuficiente para sobrevivência das fêmeas de S21.

Embora *O. niloticus* seja uma espécie eurialina, registraram-se, no presente estudo, concentrações significativamente mais elevadas de Na^+ no plasma das fêmeas de S14 em relação a S0 e S7, além de níveis testiculares gradualmente maiores deste íon acompanhando o aumento da salinidade. Estas variações iônicas podem afetar o metabolismo celular e justificar as alterações moleculares detectadas nas gônadas da espécie. Em estudo com *O. mossambicus*, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações séricas de Na^+ , K^+ e Cl^- entre tratamentos salinos (5, 10, 20 e 30 g/L) (LEE et al., 2000), mas esta espécie é mais tolerante à salinidade que *O. niloticus* (EL-SAYED, 2006b).

No presente estudo, os valores do IGS foram menores em machos de S14 e S21 indicando menor desenvolvimento testicular em peixes mantidos nas maiores salinidades. Os valores de K não apresentaram variações significativas nos machos provavelmente devido a curta duração do

experimento. A maior duração do experimento com fêmeas permitiu a detecção de valores mais elevados de K nos peixes do grupo controle (S0) em relação aos grupos tratados com sal (S7 e S14), provavelmente devido ao maior gasto de energia para osmorregulação nos grupos tratados com sal. O aumento da salinidade da água pode levar a um maior gasto energético, aumento do consumo de oxigênio dissolvido e redução do consumo de alimentos (LUZ et al., 2008; WANG et al., 1997), podendo afetar o metabolismo e as funções biológicas como observado em S14 e S21 deste estudo. No peixe mosquito *Gambusia holbrooki*, a elevação da salinidade reduz a habilidade de alimentação e a agressividade inter-específica, limitando sua capacidade invasiva (ALCARAZ; BISAZZA; GARCÍA-BERTHOU, 2008). Em um ambiente isotônico, onde os gradientes iônicos entre o sangue e a água são mínimos, a economia de energia é significativa para aumentar o crescimento somático (MORGAN; IWAMA, 1991) e também para o desenvolvimento gonadal. Por outro lado, salinidades altas restringem severamente a reprodução da tilápia, reduzindo o número e a frequência de desovas, o sucesso da eclosão e a viabilidade dos ovos (EL-SAYED, 2006b) e, além disso, reduzem o desenvolvimento testicular, interferindo na produção espermática. Em contrapartida, no salmão do Atlântico (*Salmo salar*), espécie anádroma, a salinidade da água do mar é um forte estímulo ao início da espermatogênese durante a puberdade, modulando as alterações do IGS (Melo et al., 2014).

No corrente estudo, as altas salinidades dos grupos S14 e S21 não afetaram a proporção das células germinativas nas fases espermatogonial e espermatocitária. No entanto, a fase espermiogênica foi afetada pelo aumento da salinidade da água, e essa alteração levou à redução do número de espermatozoides. De modo geral, a degeneração das células germinativas é comum na fase espermatogonial; entretanto, em algumas espécies de peixes a apoptose é mais elevada durante a espermiogênese (CORRIERO et al., 2007; SCHULZ et al., 2005). A ausência de variação da proporção das células germinativas nas fases iniciais da espermatogênese nos diferentes tratamentos pode ser relacionada às concentrações plasmáticas de 11-KT, uma vez que andrógenos atuam na indução da espermatogênese, principalmente na proliferação e diferenciação dessas células germinativas (Borg, 1994, Nader et al., 1999). No salmão do Atlântico, as pequenas variações na proporção das células espermatogênicas nos diferentes tratamentos sugerem que a salinidade afeta apenas a duração da espermatogênese (Melo et al., 2014).

O andrógeno 11-KT desempenha papel central na espermatogênese de peixes (HATEF et al., 2012; MEINA et al., 2013) e seus níveis estão relacionados de forma direta ao número de células germinativas (WU et al., 2016; ZHANG et al., 2014). Apesar dos níveis plasmáticos de 11-KT não mostrarem diferença significativa entre os tratamentos, os maiores valores em S14 e S21 sugerem uma resposta compensatória para manter a espermatogênese em meios hipertônicos. No salmão do Atlântico, exposição à água do mar durante a puberdade não afetou os níveis de 11-KT; entretanto,

os níveis deste andrógeno aumentaram conjugando salinidade elevada com menor fotoperíodo (12L:12D), provavelmente refletindo altos níveis de hormônio luteinizante (LH) para completar a espermatogênese (MELO et al., 2014). Por outro lado, o estresse hiperosmótico pode estimular a liberação de arginina-vasotocina, hormônio antidiurético, que atua diretamente na liberação de andrógenos testiculares (BALMENT et al., 2006; RAMALLO et al., 2012). A maior proporção do tecido intersticial observada em S14 pode estar relacionada, em partes, à menores diâmetros dos túbulos seminíferos nos grupos tratados.

Semelhante ao que foi observado nos machos para 11-KT, os níveis séricos de E2 também sofreram variações não significativas entre as salinidades, o que, de certa forma, justifica a ausência de diferenças marcantes na proporção dos folículos ovarianos, refletindo também nos valores do IGS. Segundo Rocha and Rocha (2006), os níveis de esteroides sexuais apresentam pequenas variações nas espécies com desenvolvimento assincrônico das células germinativas e desovas múltiplas, como a tilápia do Nilo desse estudo. Estas variações podem também ser relacionadas à ampla plasticidade da tilápia do Nilo, como uma estratégia para se adaptar em diferentes tipos de ambientes.

Nesse estudo, os maiores níveis séricos de cortisol observados em fêmeas de S14 quando comparados a S0 e S7, demonstram maior condição de estresse em salinidades altas. O aumento de cortisol após estresse foi também relatado previamente na tilápia do Nilo (CORRÊA et al., 2003) e em juvenis de *Oreochromis mossambicus* submetidos a estresse de manuseio (BARCELLOS et al., 1999; FOO; LAM, 1993), confinamento (VIJAYAN et al., 1997) ou estresse de salinidade (KAMMERER; CECH; KÜLTZ, 2010). Dependendo da intensidade, do tempo de aplicação e da duração do estresse, a reprodução de fêmeas de peixes pode ser influenciada negativa ou positivamente pelo estresse (PANKHURST, 1998; SCHRECK, 2010). Alguns estudos mostram que o estresse agudo acelera os estágios finais da ovogênese na tilápia do Nilo e reduz o intervalo entre desovas (GENNOTTE et al., 2012). Fêmeas de salmão e truta arco-íris, submetidas a estresse crônico, ovularam, em média, 2 semanas antes dos peixes não estressados (CONTRERAS-SANCHEZ et al., 1998; STRATHOLT; DONALDSON; LILEY, 1997). Em *Oreochromis aureus*, o cortisol teve efeito agudo na expressão hepática de Vtg, refletindo diretamente na vitelogênese (DING; LIM; LAM, 1994) e, em *O. niloticus*, esse hormônio causou aumento no tamanho de ovócitos (GENNOTTE et al., 2012). No presente estudo, os maiores níveis de cortisol e diâmetros dos folículos vitelogênicos, presença de núcleo excêntrico em alguns ovócitos somados a menores níveis de Vtg hepática e IHS em S14, indicam que o cortisol pode ter atuado como agente indutor da maturação final ovocitária, acelerando a ovulação da tilápia do Nilo. Considerando este efeito do ponto de vista adaptativo, a ovulação precoce pode ser uma tática reprodutiva vantajosa em condições estressantes, pois a retenção de ovócitos pode causar maior consumo de energia

(GENNOTTE et al., 2012). De fato, a presença de alguns folículos pós-ovulatórios (FPOs) nos ovários da tilápia do Nilo do presente estudo são evidências da ovulação; entretanto, as fêmeas não desovaram, uma vez que ovócitos envelhecidos ('over-ripening') foram também observados no lume ovariano. Por serem pouco frequentes e regredirem rapidamente após ovulação sem deixar marcas nos ovários, os FPOs não foram quantificados nesse estudo.

Os baixos níveis de lipídios totais observados no plasma de fêmeas de S14 do presente estudo em relação aos grupos S0 e S7 podem ser uma consequência do estresse causado pela exposição a altas salinidades. Dentre outros parâmetros hematológicos, os lipídios plasmáticos são usados como indicadores de estresse crônico (ALTAN et al., 2000; HSIEH; CHEN; KUO, 2003). Os menores valores do IHS, Vtg hepática e lipídios plasmáticos observados em fêmeas de S14 sugerem que o estresse pode alterar a mobilização de moléculas e sua circulação do fígado para as gônadas (CHANG et al., 2006), influenciando assim, na deposição desses compostos no ovócito, aumentando seu diâmetro.

Em peixes teleósteos, as células germinativas distribuídas exclusivamente em cistos sugere que cada cisto funcione como uma unidade espermatogênica independente (MELO et al., 2016). Além disso, a presença cística das células germinativas conectadas por pontes citoplasmáticas, explica o esvaziamento completo dos cistos em exemplares de S21 neste estudo. Do mesmo modo, cistos vazios, possivelmente devido à morte de células germinativas, também foram observados em testículos de zebrafish expostos a estrógenos e anti-andrógenos combinados (YIN et al., 2017). Dada a presença de pontes intercelulares entre as células germinativas que derivam de uma única célula progenitora, a deleção espontânea dessas células manifesta-se em clones germinativos inteiros em apoptose (CORRIERO et al., 2007; MCCLUSKY et al., 2008; YAZAWA et al., 2003), o que reforça que, nos peixes, estímulos pró-apoptóticos atuam em todo o cisto assim como os pró-espermatogênicos.

Em peixes, vários fatores ambientais e fisiológicos estimulam as células a sintetizarem rapidamente proteínas de choque térmico (HSPs) que regulam o metabolismo celular, crescimento, diferenciação e apoptose (DEANE; WOO, 2011; FEDER; HOFMANN, 1999). A queda dos níveis da HSP70 observada no 4º dia de tratamento em machos de S14 e S21 pode justificar o aumento da expressão de caspase-3 detectado no 9º dia de tratamento. Estes resultados sugerem que as salinidades elevadas afetam negativamente a expressão de HSP70, com consequente aumento da apoptose testicular. De fato, a ligação de HSP70 a Apaf-1, inibe a cascata de sinalização da apoptose e, conseqüentemente, a ativação das caspases efetoras como a caspase-3 (ZHANG; ZHANG; HERMAN, 2003). Além de seu papel como molécula efetora da morte celular programada por apoptose, a caspase-3 pode também estar envolvida no processo de redução citoplasmática durante a espermiogênese (Cagan, 2003). Em *Drosophila*, a maquinaria apoptótica

pode ser usada para remover conteúdos citoplásmicos desnecessários na formação de espermatozoides (Arama et al., 2003). Além disso, estudo feito em ratos também mostrou que espermátides apresentam muitas evidências histológicas e moleculares de apoptose, como vacuolização e presença de proteínas reguladoras da apoptose (BLANCO-RODRÍGUEZ et al., 1999). No presente estudo, a presença de cistos vazios nas salinidades mais elevadas são evidências claras da morte celular por apoptose, observada principalmente em peixes de S21. Essa perda de células germinativas através da apoptose durante espermatogênese desempenha papel crítico na determinação da eficiência espermatogênica (ALMEIDA et al., 2008; BAUM; ST GEORGE; MCCALL, 2005).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) tem sido utilizado em estudos imunohistoquímicos como biomarcador de proliferação celular em uma variedade de tecidos normais e patológicos, incluindo os testículos de peixes (CORRIERO et al., 2007; DOMINGOS et al., 2013; ŠTRBENC et al., 2003). No presente estudo, testículos de S14 e S21 apresentaram menores níveis deste marcador e a sua imunolocalização ocorreu principalmente em espermatogônias. PCNA é comumente detectado durante a fase espermatogonial em diversas espécies de peixes (CORRIERO et al., 2007; LOPPION et al., 2008; MIURA; MIURA; YAMASHITA, 2002) e também suporta o reparo do DNA na fase meiótica (FRANCO et al., 2010). No rio São Francisco, Brasil, aumento da apoptose de células germinativas e redução da proliferação celular foi encontrada em machos de *Prochilodus argenteus* expostos a baixa temperatura da água na região de influência de uma barragem hidrelétrica, quando comparado ao ponto não impactado pela barragem (DOMINGOS et al., 2012).

Em resumo, os resultados deste estudo indicam que as salinidades mais elevadas (S14 e S21) interferem negativamente na espermatogênese da tilápia do Nilo. A redução da expressão da HSP70 pode ser responsável por um desequilíbrio na homeostase testicular, atuando negativamente na espermatogênese e na produção espermática da tilápia do Nilo. Por se tratar de um peixe eurialino com grande plasticidade, as alterações moleculares observadas foram sutis, mesmo nas altas salinidades, permitindo a essa espécie colonizar vários ecossistemas em detrimento de espécies nativas. Por outro lado, as alterações observadas na tilápia do Nilo dos grupos S14 e S21 do presente estudo atribuídas à salinidade podem ser amplificadas nas espécies estenohalinas, que suportam estreitas variações de salinidade da água. Assim, os resultados desse estudo ampliam o conhecimento sobre os efeitos da salinidade sobre a gametogenese e reprodução de peixes e apontam a necessidade do monitoramento da salinidade como ferramenta para a preservação da biodiversidade de peixes em águas continentais.

7. CONCLUSÕES

- Fêmeas da tilapia do Nilo possuem menor resistência à salinidade do que os machos;
- As concentrações salinas não alteraram significativamente os níveis séricos de 11-KT em machos e de E2 em fêmeas, com raras diferenças significativas na proporção de células germinativas;
- Cortisol induziu a maturação final ovocitária em algumas fêmeas de S14; entretanto, o número de folículos pos-ovulatórios foi muito baixo;
- Em S14, a redução dos níveis de Vtg hepática refletiu na presença de ovócitos com deficiência de vitelo;
- Aumento de HSP70 está relacionado com aumento de PCNA e diminuição de caspase-3 em testículos de peixes expostos a meios hipertônicos (S14 e S21).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARAZ, C.; BISAZZA, A.; GARCÍA-BERTHOU, E. Salinity mediates the competitive interactions between invasive mosquitofish and an endangered fish. **Oecologia**, v. 155, n. 1, p. 205–213, 2008.
- ALMEIDA, F. F. et al. Spermatogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel model of cystic germ cell development. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 1, p. 27–34, 2008.
- ALTAN, Ö. et al. Effects of heat stress on growth, some blood variables and lipid oxidation in broilers exposed to high temperature at an early age. **British Poultry Science**, v. 41, n. 4, p. 489–493, 2000.
- ALTINOK, I.; GRIZZLE, J. M. Effects of low salinities on *Flavobacterium columnare* infection of euryhaline and freshwater stenohaline fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, n. 6, p. 361–367, 2001.
- ANDO, N. et al. A method for estimating the number of mitotic divisions in fish testes. **Fisheries Science**, v. 66, n. 2, p. 299–303, 2000.
- ANDREU-VIEYRA, C. V.; BURET, A. G.; HABIBI, H. R. Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1588–1596, 2005.
- ARAMA, E.; AGAPITE, J.; STELLER, H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. **Developmental Cell**, v. 4, n. 5, p. 687–697, 2003.
- BABIN, P. J. et al. Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. In: **The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications**. [s.l.: s.n.]. p. 39–76.
- BALLA, M. et al. Follicular cells versus oocytes: Cell population dynamics in the developing ovary. **Tissue and Cell**, v. 40, n. 5, p. 373–381, 2008.
- BALMENT, R. J. et al. Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: A review with insights from mammalian models. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 9–16, 2006.
- BANGS, P.; FRANCO, N.; WHITE, K. Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. **Cell Death Differ**, v. 7, n. 11, p. 1027–1034, 2000.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research**, v. 30, n. 6, p. 437–444, 1999.
- BATLOUNI, S. R.; NÓBREGA, R. H.; FRANÇA, L. R. Cell junctions in fish seminiferous epithelium. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 207–217, 2009.

- BAUM, J.; ST GEORGE, J.; MCCALL, K. Programmed cell death in the germline. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 245–259, 2005.
- BAZZOLI, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: GODINHO, H. P. (Ed.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 291–306.
- BHUJEL, R. C. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. **Aquaculture**, v. 181, n. 1–2, p. 37–59, 2000.
- BLANCO-RODRÍGUEZ, J. et al. Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. **Biol. Reprod.**, v. 61, n. 6, p. 1541–1547, 1999.
- BLAZER, V. S. Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 3, n. 2, p. 77–86, 1991.
- BORG, B. Androgens in teleost fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109C, n. 3, p. 219–245, 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. **Decreto nº 4.895 de 25 de novembro 2003. Dispõe sobre a autorização de uso de espaços físicos de corpos d'água de domínio da União para fins de aquicultura, e dá outras providências.** Disponível em: <www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2003/decreto-4895-25-%0Anovembro-2003-497528-norma-pe.html>. Acesso em: 2 fev. 2018.
- BRENTNALL, M. et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biology**, v. 14, n. 32, 2013.
- BRITO, T. M. D.; SILVA, A. M. C. Taxa de sobrevivência de tilápia *Oreochromis niloticus* em tanque de decantação com águas salobras em sistema intensivo de cultivo. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 2, p. 40–50, 2014.
- CAGAN, R. L. Spermatogenesis: Borrowing the apoptotic machinery. **Current Biology**, v. 13, n. 15, p. 600–602, 2003.
- CAMPBELL, B. et al. Previtellogenic oocyte growth in salmon: relationships among body growth, plasma insulin-like growth factor-1, estradiol-17beta, follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-like growth factors, steroidogenic-acute regulatory p. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 1, p. 34–44, 2006.
- CAÑEDO-ARGÜELLES, M. et al. Salinisation of rivers: An urgent ecological issue. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 157–167, 2013.
- CANONICO, G. C. et al. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. **Aquatic**

- Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 15, n. 5, p. 463–483, 2005.
- CASILLAS, E.; SMITH, L. S. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology**, v. 10, n. 5, p. 481–491, 1977.
- CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 2, p. 83–91, 2002.
- CHANG, Y. M. et al. Changes of serum biochemical indices of common carp affected by cold temperatures. **Chinese Journal Fisheries**, v. 2, p. 71–75, 2006.
- CONTRERAS-SANCHEZ, W. M. et al. Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biol Reprod**, v. 58, n. 2, p. 439–447, 1998.
- CORRÊA, S. A. et al. Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 12, p. 1725–1731, 2003.
- CORRIERO, A. et al. Germ cell proliferation and apoptosis during different phases of swordfish (*Xiphias gladius* L.) spermatogenetic cycle. **Journal of Fish Biology**, v. 70, n. 1, p. 83–99, 2007.
- DAS, P.; GUPTA, A.; MANNA, S. K. Heat shock protein 70 expression in different tissues of *Cirrhinus mrigala* (Ham.) following heat stress. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 6, p. 525–529, 2005.
- DEANE, E. E.; WOO, N. Y. S. Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, n. 2, p. 153–185, 2011.
- DI MARCO, P. et al. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. **Aquaculture**, v. 275, n. 1–4, p. 319–328, 2008.
- DING, J. L.; LIM, E. H.; LAM, T. J. Cortisol-induced hepatic vitellogenin mRNA in *Oreochromis aureus* (Steindachner). **General and Comparative Endocrinology**, v. 96, n. 2, p. 276–287, 1994.
- DOMINGOS, F. F. T. et al. 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**, v. 38, n. 6, p. 1709–1719, 2012.
- DOMINGOS, F. F. T. et al. Role of HSP70 in the regulation of the testicular apoptosis in a seasonal breeding teleost *Prochilodus argenteus* from the São Francisco river, Brazil. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 4, p. 350–356, 2013.
- DRUMMOND, C. D. et al. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed

- cell death or apoptosis in teleosts. **J Exp Zool**, v. 287, n. 2, p. 176–182, 2000.
- EL-RAEY, M. Vulnerability assessment of the coastal zone of the Nile delta of Egypt, to the impacts of sea level rise. **Ocean & Coastal Management**, v. 37, n. 1, p. 29–40, 1997.
- EL-SAYED, A.-F. M. **Tilapia culture**. Boston, USA: CABI Publishing, 2006a.
- EL-SAYED, A.-F. M. **Tilapia culture in salt water: environmental requirements, nutritional implications and economic potentials**. (A. C. P. C. y A. G. O. L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ed.) Avances en nutrición acuícola. **Anais...Nuevo León - México: VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**, 2006b
- EL-SAYED, A. F. M.; MANSOUR, C. R.; EZZAT, A. A. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. **Aquaculture**, v. 248, n. 1–4, p. 187–196, 2005.
- EL-SAYED, H. K. A.; MOHARRAM, S. G. Reproductive biology of *Tilapia zilli* (Gerv, 1848) from Abu Qir Bay, Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research.**, v. 33, n. 1, p. 379–393, 2007.
- ENGEL, K. B.; CALLARD, G. V. Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L. D. (Ed.). **The Leydig Cell**. Vienna, IL, USA: Cache River Press, 1996. p. 308–331.
- ERNST, D. H. et al. Commercial-scale production of Florida Red Tilapia seed in low and brackish-salinity tanks. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 22, n. 1, p. 36–44, 1991.
- ESSERS, J. et al. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 21, p. 9350–9359, 2005.
- FAO. **Cultured aquatic species information programme: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromisniloticus/en>>. Acesso em: 9 fev. 2016.
- FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual review of physiology**, v. 61, p. 243–282, 1999.
- FINEMAN-KALIO, A. S. Preliminary observations on the effect of salinity on the reproduction and growth of freshwater Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L .), cultured in brackishwater ponds. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 19, p. 313–320, 1988.
- FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. . et al. Efeito da suplementação da dieta com NaCl no crescimento de tilápia *Oreochromis niloticus* cultivada em diferentes salinidades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 204–211, 2002.
- FOO, J. T. W.; LAM, T. J. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol

- implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Aquaculture**, v. 115, n. 1–2, p. 145–158, 1993.
- FRANCO, A. et al. Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. **Cell and Tissue Research**, v. 340, n. 1, p. 201–210, 2010.
- GARCIA, L. DE O. et al. Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 1, p. 1–11, 2007.
- GENNOTTE, V. et al. Cortisol is responsible for positive and negative effects in the ovarian maturation induced by the exposure to acute stressors in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1619–1626, 2012.
- GRAAF, G. J.; GALEMONI, F.; HUISMAN, E. A. Reproductive biology of pond reared Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture Research**, v. 30, n. 1, p. 25–33, 1999.
- GRIER, H. J.; URIBE-ARANZÁBAL, M. The testis and spermatogenesis in teleosts. In: JAMIESON, B. (Ed.). . **Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)**. New Hampshire, Endfield, NH, USA: Science Publishers, 2009. p. 119–142.
- GRIER, H. J.; URIBE-ARANZÁBAL, M. C.; PATIÑO, R. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleost. In: JAMIESON, B. (Ed.). . **Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and neoteleostomi)**. New Hampshire, Endfield, NH, USA: Science Publishers, 2009. p. 25–84.
- GUPTA, S.; KNOWLTON, A. A. HSP60, Bax, apoptosis and the heart. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 51–58, 2005.
- GUZMÁN, J. M. et al. Expression profiles of FSH-regulated ovarian genes during oogenesis in coho salmon. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.
- HAIDER, S. G. Leydig cell steroidogenesis: Unmasking the functional importance of mitochondria. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2581–2582, 2007.
- HATEF, A. et al. Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 56–62, 2012.
- HSIEH, S. L.; CHEN, Y. N.; KUO, C. M. Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation. **Aquaculture**, v. 220, n. 1–4, p. 903–918, 2003.
- HUETTENBRENNER, S. et al. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 235–249, 2003.

- ITO, L. S. et al. Gonadal degeneration in sub-adult male pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during exposure to warm water. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 1–4, p. 421–422, 2003.
- JENKINS, V. K.; TIMMONS, A. K.; MCCALL, K. Diversity of cell death pathways: Insight from the fly ovary. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 11, p. 567–574, 2013.
- JENNINGS, D. P.; WILLIAMS, J. D. Factors influencing the distribution of Blackchin Tilapia in the Indian River Lagoon System. **Northeast Gulf Science**, v. 12, p. 111–117, 1992.
- JEPPESEN, E. et al. Ecological impacts of global warming and water abstraction on lakes and reservoirs due to changes in water level and related changes in salinity. **Hydrobiologia**, v. 750, n. 1, p. 201–227, 2015.
- KAMMERER, B. D.; CECH, J. J.; KÜLTZ, D. Rapid changes in plasma cortisol, osmolality, and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 157, n. 3, p. 260–265, 2010.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–247, 1972.
- KIM, E.-K. et al. Effect of chronic hypoxia on proliferation, apoptosis, and HSP70 expression in mouse bronchiolar epithelial cells. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 55, p. 405–411, 2006.
- 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, n. 3, p. 292–311, 2002.
- KRYSKO, D. V. et al. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. **Apoptosis**, v. 13, n. 9, p. 1065–1087, 2008.
- KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L. Desafios para a consolidação da tilapicultura no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, v. 15, n. 91, p. 14–22, 2005.
- LEE, T. H. et al. The relationship between “deep-hole” mitochondria-rich cells and salinity adaptation in the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 133–140, 2000.
- LEONHARDT, J. H. **Efeito da reversão sexual em tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757)**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 1997.
- LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479–489, 1997.
- LIGNOT, J.-H.; SPANINGS-PIERROT, C.; CHARMANTIER, G. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, p. 209–245, 2000.

- LIKONGWE, J. S. et al. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). **Aquaculture**, v. 146, n. 1–2, p. 37–46, 1996.
- LITTLE, D. C.; HULATA, G. Strategies for tilapia seed production. In: BEVERIDGE, M. C. .; MCANDREW, B. (Eds.). . **Tilapias: Biology and Exploitation**. [s.l.] Kluwer Academic Publishing, Great Britain, 2000. p. 267–326.
- LOPPION, G. et al. Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, *Scyliorhinus canicula* L. **Cell and Tissue Research**, v. 332, n. 3, p. 533–542, 2008.
- LOWE, M. R. et al. Survival, growth and reproduction of non-native Nile Tilapia II: Fundamental niche projections and invasion potential in the northern Gulf of Mexico. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.
- LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 367–389, 2010.
- LUZ, R. K. et al. Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. **Aquaculture**, v. 276, n. 1–4, p. 171–178, 2008.
- MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Human anatomy & physiology**. [s.l: s.n.]. v. 7
- MARTINEZ-PORCHAS, M.; MARTINEZ-CORDOVA, L. T.; RAMOS-ENRIQUEZ, R. Cortisol and Glucose : reliable indicators of fish stress? **Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, p. 158–178, 2009.
- MATTA, S. L. P. et al. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: The tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 970–978, 2002.
- MCANDREW, B. J. Evolution, phylogenetic relationships and biogeography. In: BEVERIDGE, M. C. M.; MCANDREW, B. J. (Eds.). . **Tilapias: Biology and Exploitation**. 1. ed. Dordrecht, Netherland: Fish and Fisheries Series, Springer, 2000. v. 25p. 1–32.
- MCCLUSKY, L. M. et al. Testicular apoptosis in feral *Clarias gariepinus* using TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 41–46, 2008.
- MCGUIRE, C. **Interactive physiological responses of Nile Tilapia to salinity- and temperature-induced stress : quantifying the regulation of apoptosis and cell cycle arrest in *Oreochromis Niloticus***. [s.l.] Portland State University, 2017.
- MEINA, E. G. et al. Effects of 17 α -ethinyloestradiol (EE2) on reproductive endocrine status in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) under differing salinity and temperature conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 134–135, p. 92–103, 2013.
- MELO, M. C. et al. Salinity and photoperiod modulate pubertal development in Atlantic salmon

- (*Salmo salar*). **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 3, p. 319–332, 2014.
- MELO, R. M. C. et al. PCNA and apoptosis during post-spawning ovarian remodeling in the teleost *Oreochromis niloticus*. **Tissue and Cell**, 2015.
- MELO, R. M. C. et al. Influence of low temperature on structure and dynamics of spermatogenesis during culture of *Oreochromis niloticus*. **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 148–156, 2016.
- MENN, F. LE; CERDÀ, J.; BABIN, P. J. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: **The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications**. [s.l: s.n.]. p. 1–37.
- MIGLIARINI, B. et al. Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine teleost *Gobius niger*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 241–247, 2005.
- MIURA, C.; HIGASHINO, T.; MIURA, T. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 5, p. 822–828, 2007.
- MIURA, C.; MIURA, T.; YAMASHITA, M. PCNA protein expression during spermatogenesis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Zoological science**, v. 19, n. 1, p. 87–91, 2002.
- MODIG, C.; WESTERLUND, L.; OLSSON, P. E. Oocyte zona pellucida proteins. In: **The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications**. [s.l: s.n.]. p. 113–139.
- MORGAN, J. D.; IWAMA, G. K. Effects of salinity on growth, metabolism, and ion regulation in juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, n. 11, p. 2083–2094, 1991.
- MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat-shock transcriptional response: cross talk between a family of heat-shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes Dev**, v. 12, p. 3788–3796, 1998.
- NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 197–206, 2009.
- OHTA, T. et al. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 970–977, 2007.
- OLSEN, R. E. et al. The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Aquaculture**, v. 280, n. 1–4, p. 232–241, 2008.
- PANKHURST, N. W. Further evidence of the equivocal effects of cortisol on in vitro steroidogenesis by ovarian follicles of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. v. 19, n. 4, p. 315–

323, 1998.

- PANKHURST, N. W. Gonadal steroids: functions and patterns of change. In: ROCHA, M. J.; ARUKWE, A.; KAPOOR, B. G. (Eds.). . **Fish reproduction**. Enfield (NH): Science Publishers, 2008. p. 67–111.
- PAYNE, A. I.; COLLINSON, R. I. A comparison of the biological characteristics of *Sarotherodon niloticus* (L.) with those of *S. aureus* (Steindachner) and other tilapia of the delta and lower Nile. **Aquaculture**, v. 30, n. 1–4, p. 335–351, 1983.
- PETERSON, M. S. et al. Reproduction in nonnative environments: establishment of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, in coastal Mississippi watersheds. **Copeia**, v. 2004, n. 4, p. 842–849, 2004.
- PICKERING, A. D. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. **Aquaculture**, v. 100, n. 1, p. 125–139, 1992.
- PLANAS, J. V.; SWANSON, P. Physiological function of gonadotropins in fish. In: ROCHA, M. J.; ARUKWE, A.; KAPOOR, B. G. (Eds.). . **Fish reproduction**. Enfield (NH): Science Publishers, 2008. p. 37–68.
- PORTER, C. M.; JANZ, D. M. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 199–206, 2003.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. et al. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): germline cysts, follicle formation and oocyte development. **Journal of Morphology**, v. 272, n. 11, p. 1290–1306, 2011.
- RAMALLO, M. R. et al. Arginine-vasotocin expression and participation in reproduction and social behavior in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, n. 2, p. 221–231, 2012.
- RAMSAY, J. M. et al. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1–4, p. 565–574, 2006.
- RIBEIRO, Y. M. et al. Germ cell proliferation and apoptosis during testicular regression in a seasonal breeding fish kept in captivity. **Tissue and Cell**, v. 49, n. 6, p. 664–671, 2017.
- ROBERTS, R. J. et al. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: A review. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, n. 10, p. 789–801, 2010.
- ROCHA, M. J.; ROCHA, E. Stress response, reproduction and endocrine disruptors. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G. (Eds.). . **Fish Endocrinology**. 2nd. ed. Enfield, New Hampshire 03748, USA: Science Publishers, 2006. p. 571–624.
- RUANE, N. M.; CARBALLO, E. C.; KOMEN, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). **Aquaculture Research**, v.

33, n. 10, p. 777–784, 2002.

SANTOS, H. B. et al. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes).

Theriogenology, v. 70, n. 9, p. 1449–1460, 2008.

SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 549–556, 2010.

SCHULZ, R. W. et al. 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. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390–411, 2010.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2002.

SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H. The reproductive organs and processes | anatomy and histology of fish testis. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 616–626.

SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H. The reproductive organs and processes | regulation of spermatogenesis. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 627–634.

SENTHILKUMARAN, B.; YOSHIKUNI, M.; NAGAHAMA, Y. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 215, n. 1–2, p. 11–18, 2004.

SINHA HIKIM, A. P.; SWERDLOFF, R. S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. **Rev Reprod**, v. 4, n. 1, p. 38–47, 1999.

SIQUEIRA-SILVA, D. H. et al. Ultrastructural analysis of spermiogenesis in the neotropical cichlid *Cichla kelberi* Kullander & Ferreira, 2006 (Perciformes: Cichlidae). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 6, p. 878–882, 2012.

SOENGAS, J. L.; ALDEGUNDE, M. Energy metabolism of fish brain. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 2002.

STICKNEY, R. R. Tilapia Tolerance of Saline Waters: A Review. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 48, n. 3, p. 161–167, 1986.

STOIMENOV, I.; HELLEDAY, T. PCNA on the crossroad of cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 3, p. 605–613, 2009.

STRATHOLT, M. L.; DONALDSON, E. M.; LILEY, N. R. Stress induced elevation of plasma cortisol in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), is reflected in egg cortisol content, but does not appear to affect early development. **Aquaculture**, v. 158, n. 1–2, p. 141–153, 1997.

ŠTRBENC, M. et al. Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the brown hare (*Lepus europaeus* L.). **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia**

- Embryologia**, v. 32, n. 1, p. 48–53, 2003.
- SURESH, A. V.; LIN, C. K. Tilapia culture in saline waters: a review. **Aquaculture**, v. 106, p. 201–226, 1992.
- SUSSEL, F. R. **Tilapicultura no Brasil e entraves na produção**. Pirassununga-SP: [s.n.].
- TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 6, n. 3, p. 287–318, 1996.
- VIDAL, M. F. Panorama da piscicultura no nordeste. n. 3, p. 13–19, 2016.
- VIJAYAN, M. M. et al. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 89–95, 1997.
- VILLEGAS, C. T. Evaluation of the salinity tolerance of *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus* and their F1 hybrids. **Aquaculture**, v. 85, n. 1–4, p. 281–292, 1990.
- WAAL, P. P. et al. Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. **Journal of Endocrinology**, v. 202, n. 2, p. 287–297, 2009.
- WANG, J.-Q. et al. Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. **Aquaculture**, v. 148, n. 2–3, p. 115–124, 1997.
- WATANABE, W. O.; KUO, C.-M. Observations on the reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in laboratory aquaria at various salinities. **Aquaculture**, v. 49, p. 315–323, 1985.
- WATANABE, W. O.; KUO, C. M.; HUANG, M. C. Salinity tolerance of Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*), spawned and hatched at various salinities. **Aquaculture**, v. 48, n. 2, p. 159–176, 1985a.
- WATANABE, W. O.; KUO, C. M.; HUANG, M. C. The ontogeny of salinity tolerance in the tilapias *Oreochromis aureus*, *O. niloticus*, and an *O. mossambicus* × *O. niloticus* hybrid, spawned and reared in freshwater. **Aquaculture**, v. 47, n. 4, p. 353–367, 1985b.
- WEBER, L. P.; JANZ, D. M. Effect of beta-naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. **Aquatic Toxicology**, v. 54, n. 1–2, p. 39–50, 2001.
- WOOTTON, R. J.; SMITH, C. Gametogenesis. In: **Reproductive biology of teleost fishes**. 1. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2015. p. 46–80.
- WU, L. et al. R-spondin1 signaling pathway is required for both the ovarian and testicular development in a teleosts, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 230–231, p. 177–185, 2016.

- YARON, Z.; LEVAVI-SIVAN, B. Endocrine regulation of fish reproduction. In: FARRELL A.P (Ed.). . **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. San Diego: Academic Press, Elsevier Inc., 2011. v. 2p. 1500–1508.
- YAZAWA, T. et al. Abnormal spermatogenesis at low temperatures in the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*: Possible biological significance of the cessation of spermatocytogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, n. 1, p. 60–66, 2003.
- YIN, P. et al. Diethylstilbestrol, flutamide and their combination impaired the spermatogenesis of male adult zebrafish through disrupting HPG axis, meiosis and apoptosis. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 129–137, 2017.
- YIN, Z.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio* L). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 5, n. 7, p. 519–529, 1995.
- YOUNG, G. et al. Gonadal steroidogenesis in teleost fish. In: MELAMED, P.; SHERWOOD, N. (Eds.). **Hormones and their receptors in fish reproduction**. Singapore: World Scientific, 2005. p. 155–223.
- ZHANG, J. H.; ZHANG, Y.; HERMAN, B. Caspases, apoptosis and aging. **Ageing Research Reviews**, v. 2, n. 4, p. 357–366, 2003.
- ZHANG, X. et al. Isolation of doublesex- and mab-3-related transcription factor 6 and its involvement in spermatogenesis in tilapia. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 6, p. 136, 2014.

9. ANEXOS

Os seguintes artigos foram publicados durante o período de elaboração do presente trabalho:

- Ribeiro, Y.M., Matos, S.A. de, Domingos, F.F.T., Santos, H.B. dos, Cruz Vieira, A.B., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2017. Germ cell proliferation and apoptosis during testicular regression in a seasonal breeding fish kept in captivity. *Tissue Cell* 49, 664–671.
- Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Vieira, A.B.C., Prado, P.S., da Silva, M.A.N., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2017. Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Sci. Total Environ.* 592, 693–703.