

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Biologia reprodutiva, expressão de IGF1 e IGF2, proliferação e
morte celular durante a maturação testicular do cascudo
Hypostomus garmani no alto Rio das Velhas

Davidson Peruci Moreira

Belo Horizonte – MG

2018

Davidson Peruci Moreira

Biologia reprodutiva, expressão de IGF1 e IGF2, proliferação e morte celular durante a maturação testicular do cascudo *Hypostomus garmani* no alto Rio das Velhas

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2018

Esta dissertação foi realizada no laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Professora Dra. Elizete Rizzo e com apoio das seguintes instituições:

- 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)

Dedico essa dissertação a meus pais por sempre acreditarem no meu potencial e estarem ao meu lado em todos os momentos.

Agradecimentos

- A professora Dra. Elizete Rizzo pela confiança, paciência, ensinamentos e orientação durante toda minha jornada científica;
- Aos professores Rafael Melo e Paula Prado pelos ensinamentos, amizade e disponibilização de material para iniciar meus trabalhos na linha de pesquisa do LabIctio;
- A Mônica Ricardo pela amizade e ensinamentos técnicos de rotina do laboratório;
- Aos amigos do laboratório de Ictiohistologia por me proporcionarem momentos incríveis e trocas de experiências: Alessandro, Ana Paula, Augusto, Camila, Cláudia, Francisco, Letícia, Lorenço, Luís e especialmente ao André e Yves.
- Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e seus coordenadores;
- Aos professores da graduação e pós-graduação pelos ensinamentos e exemplo de profissionais;
- Aos meus velhos amigos da graduação e pós-graduação;
- Aos meus familiares que sempre me apoiaram em minhas decisões. Meus pais: Dulce e Raimundo; irmã: Hellen.
- A Thaís por estar ao meu lado durante toda minha jornada acadêmica. A seus pais, Simone e Alexandre, e irmão, Thiago, por fazerem parte da minha vida nos últimos dez anos.
- A Deus por me dar forças para seguir em frente nos momentos difíceis da minha vida.

Sumário

| | |
|---|----|
| Introdução geral..... | 1 |
| Estrutura das gônadas e gametogênese | 2 |
| Proliferação e morte celular | 5 |
| Controle hormonal da gametogênese | 6 |
| Fatores de crescimento semelhante à insulina..... | 7 |
| Espécie de estudo | 11 |
| Área de estudo | 12 |
| Justificativa..... | 13 |
| Objetivos..... | 14 |
| Objetivo geral..... | 14 |
| Objetivos específicos..... | 14 |
| Artigo 1 a ser submetido..... | 15 |
| Introdução..... | 16 |
| Material e métodos | 18 |
| Resultados | 19 |
| Discussão..... | 22 |
| Artigo 2 a ser submetido..... | 31 |
| Introdução..... | 32 |
| Metodologia | 33 |
| Resultados | 36 |
| Discussão..... | 38 |
| Conclusão | 49 |
| Referências | 50 |

Resumo

A reprodução de muitas espécies de peixes teleósteos é um evento cíclico anual onde milhares a milhões de gametas são produzidos. Durante o ciclo reprodutivo, ovários e testículos de peixes sofrem intensa remodelação para suportar a produção de gametas, sendo a dinâmica morfológica gonadal guiada pela ação de diversos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Dentre estes, a influência dos fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs) na dinâmica de proliferação e morte celular durante a gametogênese é pouco investigada. Estudos sobre a biologia reprodutiva e a cascata de eventos moleculares que ocorrem durante a gametogênese e maturação gonadal de peixes fornecem dados importantes que podem ser aplicados à criação comercial e à conservação da biodiversidade. O presente trabalho teve por objetivo analisar a biologia reprodutiva, a espermatogênese e maturação testicular de *Hypostomus garmani* (Siluriformes: Loricariidae) no alto Rio das Velhas, utilizando histologia, histoquímica de carboidratos, morfometria e imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que o período da desova de *H.garmani* concentra-se de dezembro a março, com desova do tipo parcelada. Os folículos vitelogênicos apresentaram grande diâmetro, zona radiata espessa, células foliculares colunares e a presença de glicoproteínas neutras e mucopolissacarídeos em suas camadas envoltórias. Nos testículos, a expressão de IGF1 predominou nos estádios de repouso e maturação enquanto ambos, IGF1 e IGF2, ocorreram nos estádios maduro e espermiado. Estes resultados indicam que a proliferação das células germinativas (Ki67-positivas) foi influenciada principalmente pela ação de IGF1 nas fases iniciais da maturação testicular enquanto a remodelação testicular foi influenciada pela ação combinada de IGF1 e IGF2. A apoptose (células TUNEL-positivas) foi mais frequente nos espermatócitos e espermátides quando a expressão de IGF1 e IGF2 foi reduzida. Nossos resultados sugerem que *H. garmani* desova em ambientes sujeitos a abrasão, possui ovos adesivos, exhibe comportamento de cuidado parental e que a expressão de IGF1 e IGF2 modula a dinâmica de proliferação e morte celular ao longo da maturação testicular.

Palavras chave: reprodução, loricarídeo, espermatogênese, IGF, proliferação, apoptose.

Abstract

The reproduction of many teleost fish species is an annual cyclic event where thousands to millions of gametes are produced. During the reproductive cycle, fish ovaries and testes undergo intense remodeling to support the production of gametes, being the gonadal morphological dynamics guided by the action of several endocrine, paracrine and autocrine factors. Among these, the influence of insulin-like growth factors (IGFs) on the proliferation and cell death dynamics during gametogenesis is poorly investigated. Studies about reproductive biology and molecular events cascade that occur during gametogenesis and gonadal maturation of fish provide important data, which can be applied to commercial breeding and biodiversity conservation. The present work had the goal of analyzing the reproductive biology, spermatogenesis and testicular maturation of *Hypostomus garmani* (Siluriformes: Loricariidae) in upper Rio das Velhas, using histology, carbohydrate histochemistry, morphometry and immunohistochemistry. The results demonstrated that the spawning period of *H. garmani* is concentrated from december to march, with partitioned spawning. The vitellogenic follicles presented large diameter, thick zona radiata, columnar follicular cells and the presence of neutral glycoprotein and mucopolysaccharides in their enveloping layers. In the testis, IGF1 expression predominated in the stages of resting and maturation while both, IGF1 and IGF2, occurred in the mature and spawned stages. These results indicate that germ cell proliferation (Ki67-positive cells) was influenced mainly by the action of IGF1 in the early stages of testicular maturation while testicular remodeling was influenced by the combined action of IGF1 and IGF2. Apoptosis (TUNEL-positive cells) was more frequent in spermatocytes and spermatids when IGF1 and IGF2 expression was reduced. Our results suggest that *H. garmani* spawns in environments subject to abrasion, has adhesiveness eggs, exhibits parental care behavior and the expression of IGF1 and IGF2 modulates the dynamics of proliferation and cell death throughout testicular maturation.

Key words: reproduction, loricarídeo, spermatogenesis, IGF, proliferation, apoptosis.

Lista de Figuras

Introdução Geral

- Figura 1: Esquema simplificado da ação do IGF1, IGF2 e insulina. -----8
- Figura 2: Desenho esquemático das vias endócrina e autócrina/parácrina dos fatores de crescimento semelhante à insulina 1 (Igf1) e 2 (Igf2) em gônadas de peixes. -----9
- Figura 3: Exemplar macho de *Hypostomus garmani* -----11

Artigo 1

- Figura 1 – Relação peso-comprimento de fêmeas (a) e machos (b) de *Hypostomus garmani* do alto Rio das Velhas. -----27
- Figura 2 - Secções histológicas das gônadas de *Hypostomus garmani* corados com hematoxilina-eosina (a-f, i-l), alcian blue ph 2,5 (g) e ácido periódico de Schiff (PAS) (h). ----- 29
- Figura 3 - Proporção (%) dos estádios de maturação gonadal de fêmeas (a) e machos (b) de *Hypostomus garmani* do alto Rio das Velhas entre junho/2014 e março/2015. ----- 30
- Figura 4 – Variações do Índice gonadossomático (a), Fator de condição e Fulton (b) de fêmeas e machos de *Hypostomus garmani* e temperatura da água do alto Rio das Velhas entre junho/2014 e março/2015. ----- 30

Artigo 2

- Figura 1 – Proporção de células germinativas e células de Sertoli dos machos de *Hypostomus garmani* do alto rio das Velhas que expressam ki67 (a) IGF1 (b) IGF2 (c), células TUNEL-positivas (d) e percentual total de expressão das 3 proteínas e reação TUNEL-positiva (e) em diferentes estágios de maturação testicular. ----- 43
- Figura 2 - Reação imunohistoquímica para Ki67 (a-d) e TUNEL (e-h) em túbulos seminíferos de *Hypostomus garmani*. ----- 45
- Figura 3 - Reação imunohistoquímica para IGF1 e IGF2 em túbulos seminíferos de *Hypostomus garmani*. ----- 47
- Figura 4 – Biplot da análise de componentes principais (PCA) mostrando a associação entre marcação de Ki67, IGF1, IGF2 e TUNEL por tipo celular e estágio de maturação testicular de *Hypostomus garmani*. ----- 48

Lista de tabelas

Artigo 1

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos da água no alto Rio das Velhas. ----- 26

Tabela 2: Distribuição do *Hypostomus garmani* por classe de comprimento total por estágio do ciclo reprodutivo capturados no alto Rio das Velhas. ----- 26

Artigo 2

Tabela 1: Diâmetro nuclear, proporção (%) de células germinativas, diâmetro do túbulo seminífero (TS), índice gonadossomático (IGS) e fator de condição de Fulton (K) por estágio de maturação testicular de *Hypostomus garmani* do alto Rio das Velhas, Brasil -
----- 42

Introdução geral

A reprodução dos peixes tem alta relevância no conhecimento da biologia desses animais e na conservação da ictiofauna. É também essencial na manipulação da reprodução em cativeiro e para desenvolvimento da piscicultura com espécies nativas. Embora os peixes representem o maior grupo dentre os vertebrados, o conhecimento da biologia reprodutiva está limitado principalmente a espécies usadas como modelo biológico em pesquisas científicas das áreas médica e na aquacultura (Schulz et al. 2010).

Em peixes assim como em outros vertebrados, o sistema nervoso está ativamente envolvido no controle da reprodução. Estímulos ambientais interferem na atividade reprodutiva por modular a produção de hormônios envolvidos com a reprodução. Esses estímulos são convertidos em informações sensoriais que acarretam ativação do eixo hipotálamo-pituitária-gônada (HPG), responsável por regular a gametogênese e maturação gonadal (Kah et al. 1993). Para muitas espécies de peixes teleósteos a reprodução é um evento cíclico que se repete a cada ano. Durante cada ciclo reprodutivo, milhares a milhões de ovócitos e espermatozoides são produzidos durante sucessivos eventos de desova, e tanto o número de gametas quanto o tipo de desova variam entre espécies, dependendo do tamanho corporal, história evolutiva e estratégias reprodutivas (Grier 2000; Wildner et al. 2013).

Ao longo da evolução, os peixes desenvolveram uma grande variedade de estratégias reprodutivas para colonizar diversos tipos de ambientes e garantir a preservação da espécie (Vazzoler, 1996; Coward et al. 2002). As estratégias reprodutivas englobam um conjunto de características morfológicas e comportamentais, com bases hereditárias, que implicam em sucesso reprodutivo e no equilíbrio populacional (Stearns, 1992). Elas são também consideradas adaptações evolutivas de uma espécie, que respondem a diferentes variações do ambiente onde estão inseridas. As estratégias reprodutivas dos animais permitem otimizar a relação entre gasto energético da reprodução e o aumento da expectativa de vida da prole, até que esta atinja a fase adulta e possa reproduzir (Wootton, 1984; Roff, 1992; Pianka, 2000). Em relação aos peixes de água doce da América do Sul, Winemiller (1989) reconheceu um contínuo entre três estratégias reprodutivas básicas: 1) estratégia oportunista, compreende espécies de colonização rápida, maturação precoce, reprodução contínua com alta fecundidade e baixa sobrevivência dos juvenis; 2) estratégia de equilíbrio, caracterizada pela presença de cuidado parental, reprodução não sazonal ou contínua

com baixa fecundidade e alta sobrevivência dos juvenis; e 3) estratégia sazonal, caracterizada pela reprodução sincronizada com a estação chuvosa, migração reprodutiva, ausência de cuidado parental e alta fecundidade. A maioria dos teleósteos brasileiros, incluindo os utilizados em aquacultura, apresenta gametogênese em sexos separados, fertilização externa e embriões que desenvolvem sem ou com algum tipo de cuidado parental (Godinho 2007).

A produção dos gametas é um evento complexo e organizado que ocorre dentro das gônadas. A gametogênese compreende o processo no qual os gametas feminino e masculino são formados, onde ovogônias e espermatogônias diploides proliferam e gradativamente se diferenciam para formar células germinativas haploides. As ovogônias e espermatogônias se mantêm em mitose durante toda a vida reprodutiva a fim de manter a produção constante de gametas (De Rooij and Russell 2000; Lubzens et al. 2010).

Estrutura das gônadas e gametogênese

Ovários de teleósteos são revestidos por tecido conjuntivo, a túnica albugínea, que emite projeções para o interior dos ovários formando lamelas ovulíferas que contém ovogônias e folículos em diferentes fases de desenvolvimento (Bazzoli 2003). A formação dos folículos em teleósteos inicia com a divisão mitótica das ovogônias e das células pré-foliculares nas lamelas ovulíferas e, ovogônias se tornam ovócitos quando iniciam a meiose. A meiose é interrompida na prófase-I, sendo retomada na maturação final ovocitária. Durante a foliculogênese o ovócito é envolto pelas células pré-foliculares, que progressivamente circundam cada ovócito, passando a ser reconhecidas como células foliculares, homólogas as células da granulosa de mamíferos. Externamente, forma-se a teca de tecido conjuntivo que vasculariza o complexo folicular, o qual é formado pelos compartimentos germinal e intersticial separados por uma membrana basal. As células da teca juntamente com as células foliculares são responsáveis pela produção de hormônios esteroide sexuais (Grier et al. 2009).

Durante o desenvolvimento dos folículos, os ovócitos passarão pelas fases de crescimento primário, secundário e maturação antes de serem ovulados e posteriormente desovados (Lubzens et al. 2010). O crescimento primário inclui os estágios perinucleolares e a formação de alvéolos corticais. A vitelogênese ocorre durante o crescimento secundário que se caracteriza pela incorporação de vitelogenina via endocitose mediada por receptor e pelo acúmulo de proteínas vitelínicas nos glóbulos de

vitelo (Patino and Sullivan 2002). A maturação final ovocitária é caracterizada pela interrupção da vitelogênese, retomada da meiose e quebra da vesícula germinativa culminando com a ovulação e desova (Lubzens et al., 2010). Após a desova, os ovários apresentam estruturas remanescentes dos folículos ovarianos denominados folículos pós-ovulatórios e folículos atrésicos, originados da degeneração dos folículos vitelogênicos ovulados ou não ovulados, respectivamente. Folículos pós-ovulatórios são reabsorvidos em poucos dias após desova ao passo que folículos atrésicos necessitam de meses para serem totalmente removidos do ovário (Drummond et al. 2000; Santos et al. 2005).

Os testículos de peixes são delimitados pela túnica albugínea, que emite septos para o interior das gônadas, delimitando os compartimentos tubular e intersticial. O compartimento tubular é formado pelos túbulos seminíferos sendo delimitado por uma membrana basal e células peritubulares mioide. Dentro dos túbulos seminíferos são encontrados cistos de células germinativas envolvidos por prolongamentos das células de Sertoli. Além de formar cistos, as células de Sertoli nutrem as células germinativas, produzem hormônios, atuam na interface de comunicação das células germinativas com o compartimento intersticial e fagocitam espermatozoides residuais após espermição. No interstício testicular são encontradas células de Leydig responsáveis pela produção de esteroides sexuais, além de vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos, mastócitos, macrófagos e células nervosas (Grier 1981; Schulz et al. 2010). O processo espermatogênico é bem conservado entre os vertebrados e morfofuncionalmente pode ser dividido em três fases: espermatogonial ou mitótica, espermatocitária ou meiótica e espermiogênica ou diferenciação (Nóbrega et al. 2009; Schulz et al. 2010).

A fase espermatogonial tem início quando espermatogônias tronco tipo A indiferenciadas (G_{Aund}) são envolvidas pela célula de Sertoli formando os cistos iniciais. As G_{Aund} são reconhecidas pelo seu grande tamanho e por serem células únicas não conectadas por pontes citoplasmáticas a seus clones. Quando começam a proliferar, as células filhas podem se diferenciar e passam então a ser reconhecidas como espermatogônias tipo A diferenciadas (G_{Adif}), que são ligadas umas às outras pelas pontes citoplasmáticas. Assim, todas as células de um cisto são clones de uma única célula. As G_{Adif} sofrem sucessivas divisões mitóticas e dão origem as espermatogônias tipo B (G_B), que se dividem mais rapidamente que as do tipo A e podem ter muitas gerações (Schulz et al. 2010). O número de gerações espermatogoniais e o volume celular variam entre espécies sendo filogeneticamente determinado (Nóbrega et al.

2009; Lacerda et al. 2014). Análises morfométricas mostram que o volume celular decresce da G_{Aund} para a última geração de G_{B} ao passo que o número de células por cisto aumenta (Schulz et al. 2005).

A fase espermatocitária tem início quando as G_{B} entram na primeira divisão meiotica e esta célula passa a ser denominada espermatócito primário (C_1). Os cistos de C_1 são frequentemente encontrados nos testículos, devido à longa duração da primeira divisão meiótica. Eles podem ser facilmente identificados devido ao seu grande tamanho e características nucleares, como condensação da cromatina. Classicamente são reconhecidos os estágios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Ao final da meiose I os pares de cromossomos homólogos são separados nos núcleos dos espermatócitos secundários (C_2) que passam pela segunda divisão meiotica. A meiose II é uma fase mais rápida porque não envolve síntese de DNA, apenas separação das cromátides irmãs. As células formadas no final desse processo são haploides e denominadas espermátides (Schulz et al. 2010).

A espermiogênese consiste em uma série de modificações que ocorrem nas espermátides para se tornarem espermatozoides. Durante esse processo as espermátides sofrem intensa compactação da cromatina, eliminação de organelas e partes de seu citoplasma, gerando corpos residuais fagocitados pelas células de Sertoli. Nessa fase, as espermátides ganham um flagelo, as pontes citoplasmáticas são rompidas, as células são individualizadas e os espermatozoides são formados. Ao final desse processo, os prolongamentos das células de Sertoli se rompem e os espermatozoides são liberados no lúmen tubular (Schulz et al. 2010).

Baseado na distribuição e localização dos cistos de espermatogônias nos túbulos seminíferos, os testículos apresentam dois tipos de arranjos espaciais (Grier 1981). No primeiro deles, (distribuição espermatogonial restrita) as espermatogônias estão localizadas mais próximas a túnica albugínea e à medida que as células se dividem e entram em meiose, os cistos vão se aproximando da região central dos testículos. Este padrão é comumente encontrado nos peixes das ordens Atheriniformes, Cyprinodontiformes e Baloniformes. No segundo tipo (distribuição espermatogonial irrestrita), os cistos de espermatogônias estão espalhados por todo testículo. Este último padrão é característico de peixes das ordens Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes e Salmoniformes (Parenti and Grier 2004).

Gônadas de peixes podem ser classificadas em estádios de maturação gonadal de acordo com a distribuição e fase do desenvolvimento dos folículos ovarianos e dos

cistos de células espermatogênicas. A análise dos estádios de maturação gonadal constitui-se como uma importante ferramenta para compreender o comportamento reprodutivo de uma espécie em seu habitat (Bazzoli, 2003). Dependendo da espécie e metodologia de análise utilizada, diferentes escalas têm sido utilizadas para estudar os estádios de maturação das gônadas (Grier 2000; Prado et al. 2011). De maneira geral, os estádios mais utilizados são repouso, maturação inicial, maturação avançada ou maduro e desovado/espermiado (Rizzo and Bazzoli, 2014). Durante o ciclo reprodutivo, as gônadas de peixes sofrem intensa remodelação para suportar a produção de gametas e toda a dinâmica gonadal é guiada pela ação de hormônios reprodutivos e fatores de proliferação, crescimento e morte celular (Lubzens et al. 2010).

Proliferação e morte celular

A proliferação celular é um processo biológico essencial para todos os organismos vivos devido ao seu papel no crescimento e manutenção da homeostase tecidual. Os sinais de proliferação estão sob sofisticado controle de genes reguladores que modulam o ciclo celular através de um grande número de proteínas, tais como as ciclinas (Bologna-Molina et al. 2013). Os marcadores de proliferação são fatores, cofatores ou proteínas específicas do ciclo celular cuja presença em uma célula servem como indicador de célula em divisão mitótica (Kelman 1997). O Ki67 é um clássico marcador de proliferação celular, sendo muito utilizado em pesquisas científicas e diagnósticos médicos. Esta proteína está presente no núcleo nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), enquanto células em repouso e quiescentes (fase G0) não expressam esse marcador (Scholzen 2000). O Ki67 é uma molécula surfactante que envolve os cromossomos, impedindo sua agregação em uma única massa de cromatina após a desmontagem do envelope nuclear, permitindo a motilidade dos cromossomos e a eficiente interação com o fuso mitótico (Cuylen et al. 2016).

Assim como a proliferação celular, a morte celular programada está sob fino controle de genes reguladores que codificam uma série de proteínas que coordenam a morte da célula sem causar reação inflamatória (Porter and Jänicke 1999). A apoptose é um tipo de morte celular programada imprescindível para manter o número apropriado de células em um tecido. Neste processo, a célula degrada seus componentes internos de maneira coordenada e fragmenta-se formando corpos apoptóticos que são englobados por células fagocíticas (Galluzzi et al. 2012). Células em apoptose podem ser reconhecidas por alterações morfológicas tais como: picnose nuclear (condensação da

cromatina), cariorrexe (fragmentação nuclear) e formação de corpos apoptóticos (Galluzzi et al. 2007). Uma forma alternativa e eficiente de reconhecer células em apoptose é a utilização da técnica de TUNEL que identifica o DNA fragmentado no interior da célula (Gavrieli et al. 1992). A fragmentação do DNA requer uma especializada maquinaria envolvendo uma família de proteases chamadas de caspases (Porter and Jänicke 1999). As caspases ativam endonucleases que clivam o DNA em regiões específicas, gerando fragmentos de 180-200 pares de bases nucleotídicas (Huettenbrenner et al. 2003). No processo apoptótico, a caspase-3 é uma molécula efetora com ação proteolítica sobre uma grande variedade de proteínas celulares (Brentnall et al. 2013).

A dinâmica da proliferação e morte das células germinativas varia de acordo com a fase de maturação gonadal e também da estratégia reprodutiva da espécie (Santos et al. 2008; de Franca et al. 2015). Embora essa dinâmica tenha sido explorada em algumas espécies de peixes (Chaves-Pozo et al. 2005; Corriero et al. 2007; Ribeiro et al. 2017), estudos sobre proliferação e morte durante a gametogênese de Siluriformes são escassos. Além disso, poucos estudos abordam os fatores que podem interferir nesse processo.

Controle hormonal da gametogênese

Sob influência de estímulos ambientais, o hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que atua sobre a pituitária, a qual libera os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), os quais são os principais reguladores da fisiologia ovariana e testicular (Lubzens et al. 2010; Schulz et al. 2010).

A proliferação das ovogônias, células pré-foliculares e formação dos folículos ovarianos em peixes ocorre sob ação do FSH e do 17β -estradiol (E2). O principal estímulo para a produção de E2 é a presença do FSH, que induz a produção de testosterona nas células especiais da teca e sua conversão em E2 nas células foliculares. A formação dos alvéolos corticais e a vitelogênese são acompanhadas pelo aumento dos níveis de FSH e E2 (Campbell et al. 2006; Young et al. 2005).

A maturação final ocorre concomitantemente com elevados níveis de LH que leva as células foliculares a produzir o esteroide indutor da maturação (MIS), ao passo que reduz drasticamente a produção de E2. O MIS é um derivado da progesterona que se liga a um receptor de membrana do ovócito e induz a produção do fator promotor da

maturação (MPF), que juntamente com fatores de crescimento, são responsáveis pela retomada da prófase I até metafase II (Nagahama and Yamashita 2008).

Nos testículos de peixes o FSH regula as atividades da célula de Sertoli como o suporte estrutural e nutricional que garantem o desenvolvimento das células germinativas (Huhtaniemi and Themmen 2005). Entretanto, pouco se sabe do papel do FSH na espermatogênese de peixes quando comparada a de mamíferos. Um estudo realizado com salmão demonstrou que elevados níveis de FSH coincidem com a proliferação espermatogonial, ao passo a redução desse hormônio ocorre no período não reprodutivo (Campbell et al. 2003). Além de regular a produção de esteroides sexuais nas células de Leydig, o LH está envolvido nos estágios finais de maturação das células germinativas. Em *Oncorhynchus mykiss* baixos níveis plasmáticos de LH foram detectados no período de proliferação das espermatogônias, mas seus níveis se elevaram com o início da meiose e se mantiveram até a espermição (Gomez et al. 1999), em um padrão oposto ao observado para o FSH. O principal esteroide produzido pela célula de Leydig é a 11-ketotestosterona e sua função está intimamente ligada ao início da proliferação espermatogonial (Miura et al. 1991). Interessantemente, o FSH pode induzir a produção de 11-ketotestosterona em cultura de testículos de enguia japonesa, o que demonstra seu papel indutor da esteroidogênese testicular (Ohta et al. 2007).

Apesar de o eixo HPG ser a principal via envolvida na regulação da gametogênese, hormônios produzidos localmente podem agir em conjunto com o eixo HPG. Alguns fatores de crescimento produzidos por células somáticas e germinativas, incluindo os membros da família do fator de crescimento transformador beta (TGF β), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento derivado do soma gonadal (GSDF) e hormônio anti-Mulleriano (AMH), são capazes de modular a proliferação celular nas gônadas de maneira parácrina e/ou autócrina (Duan 1997; Miura and Miura 2001; Sawatari et al. 2007). Dessa forma, o correto funcionamento das gônadas, fecundidade e fertilidade são regulados por interação de fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos.

Fatores de crescimento semelhante à insulina

Os IGFs são pequenos hormônios polipeptídicos, estruturalmente semelhantes à pro-insulina, que desempenham papel central na regulação do crescimento em todos os vertebrados. Estudos realizados em várias espécies sugerem que o sistema de sinalização da família IGF surgiu nos vertebrados mais primitivos. A nível celular, a via

de sinalização IGF pode desencadear uma variedade de respostas biológicas, incluindo alteração do metabolismo, crescimento, proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação (Wood et al. 2005).

Nos vertebrados, IGF1 e IGF2 são os principais representantes da família IGF e são produzidos em praticamente todos os tecidos. Os efeitos fisiológicos desses fatores são mediados pela ativação de receptores de membrana do tipo tirosina quinase: o receptor de insulina (INSR) e o receptor de fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF1R), dos quais existem mais de uma isoforma. A complexidade dos sinais gerados resulta da possibilidade de interação da insulina, IGF1 e IGF2 com afinidade a diferentes isoformas de INSR e IGF1R (Fig 1). Além destes receptores, existe o receptor do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2 (IGF2R), que parece apenas possuir função de eliminar os peptídeos de IGF2 circulantes (Griffeth et al. 2014).

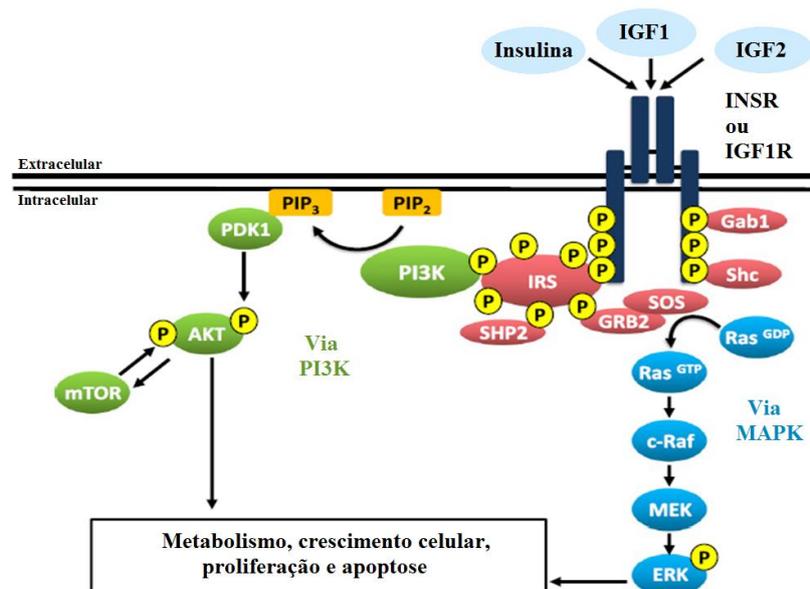


Figura 1: Esquema simplificado da ação do IGF1, IGF2 e insulina. O efeito da ligação dos peptídeos aos receptores resulta em inúmeras fosforilações em uma complexa rede de sinalização. As duas principais vias de sinalização envolvidas são as vias fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e a Proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK). Juntos, esses sinais estimulam uma série de efeitos, incluindo mitose, expressão gênica, transporte de glicose e síntese de glicogênio. Adaptado de Griffeth et al. (2014).

O principal estímulo para a produção e liberação de IGFs é o hormônio do crescimento (GH) secretado pela pituitária. O controle da liberação do GH depende da produção do hormônio liberador de GH (Ghrh) pelo hipotálamo. O GH estimula o fígado a produzir os IGFs que atuam de maneira endócrina por todo o corpo. O GH

pode também estimular a síntese de IGFs nas gônadas, onde provavelmente estes fatores atuam de maneira parácrina/autócrina modulando a atividade reprodutiva. Quando atua de maneira endócrina, o IGF1 é o principal *feedback* negativo para inibir a liberação do Ghrh e do GH. Elevados níveis de GH estimulam o hipotálamo a liberar somatostatina, que inibe a secreção de GH (Fig 2) (Reinecke 2010a). Recentemente, foi reconhecido um terceiro tipo, IGF3, que parece ser produzido exclusivamente em gônadas de peixes (Wang et al. 2008) e tem papel na regulação da proliferação espermatogonial de zebrafish (Nóbrega et al. 2015; Morais et al. 2017) .

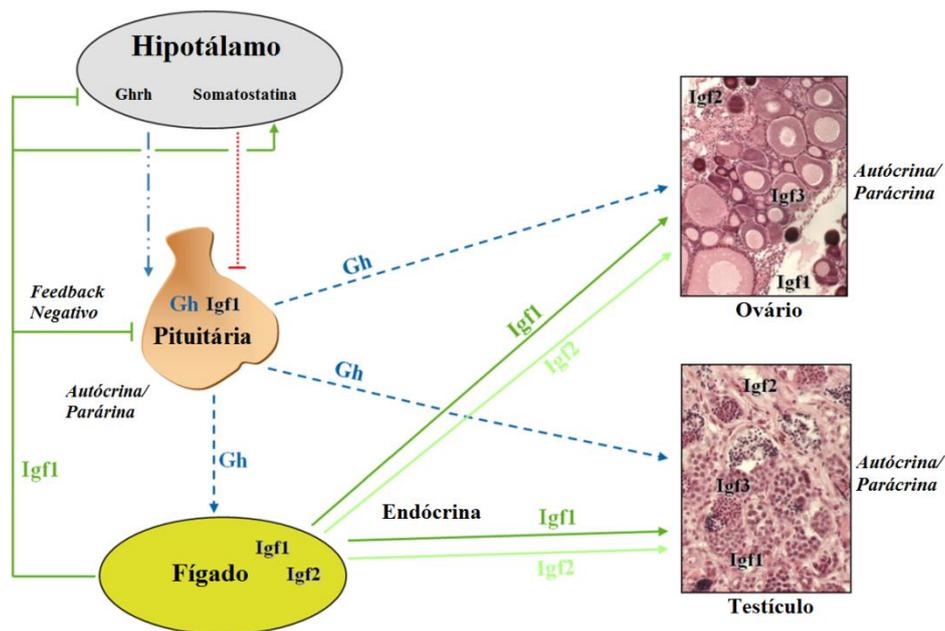


Figura 2: Desenho esquemático das vias endócrina e autócrina/parácrina dos fatores de crescimento semelhante à insulina 1 (Igf1) e 2 (Igf2) em gônadas de peixes. A presença de Igf3 também é mostrada. Adaptado de M. Reinecke, (2010a).

Em fêmeas de *Pagrus major*, *Sparus aurata* e *Oreochromis niloticus*, a expressão de *igf1* mRNA foi detectada em células foliculares durante o crescimento dos ovócitos, no ooplasma de folículos perinucleolares e células da teca de folículos pré-vitelogênicos com vesículas corticais e vitelogênicos (Kagawa et al. 1995; Perrot et al. 2000; Berishvili et al. 2006). Recentemente a presença do peptídeo IGF1 foi identificada em ovogônias, células foliculares e no ooplasma de folículos vitelogênicos do lambari *Astyanax fasciatus* (Prado et al. 2018) Em contraste, a expressão de *igf2* mRNA foi encontrada apenas em células foliculares de folículos vitelogênicos em *O.niloticus* e *Seriola quinqueradiata* (Berishvili et al. 2006; Higuchi et al. 2016) e de folículos pré-vitelogênicos de *A. fasciatus* (Prado et al. 2018). Estudos da maturação ovocitária em

diferentes espécies de peixes revelaram que o IGF2 pode induzir a retomada da meiose e aumentar a competência de maturação dos ovócitos (Picha et al. 2012). Em ovários fetais de camundongos, as ações combinadas do fator de células-tronco (SCF), fator inibitório de leucemia (LIF) e IGF1 são necessárias para a máxima inibição da apoptose das células germinativas (Morita et al. 1999).

A presença de Igf1 mRNA e/ou o peptídeo foi reportado em espermatogônias, espermatócitos, células de Sertoli e Leydig de peixes como truta, tilápia, robalo e lambari (Le Gac et al. 1996; Berishvili et al. 2006; Viñas and Piferrer 2008; Prado et al. 2018). Sua função parece estar ligada a esteroidogênese e principalmente a proliferação espermatogonial, bem como na diferenciação em espermatócitos e inibição da apoptose (Nakayama et al. 1999; Yao et al. 2017). Camundongos machos knockout para Igf1 são anões inférteis e apresentam redução dos níveis de testosterona (Baker et al. 1996). Esses resultados não apenas destacam a ação do IGF1 no crescimento e desenvolvimento, mas também o seu papel na função reprodutiva. Estudos com IGF2 em testículos são escassos, mas sabe-se que ele desempenha papel fundamental no desenvolvimento embrionário e fetal (Constância et al. 2002). A expressão de Igf2 mRNA foi relatada em testículos de *Cyprinus carpio* (Tse et al. 2002), *O. niloticus* (Caelers et al. 2004) e sua deficiência relacionada a hipoespermatogênese em humanos (Tang et al. 2016). Entretanto, o conhecimento sobre a função dos IGFs na reprodução de peixes ainda é limitado a zebrafish e algumas espécies de interesse econômico das regiões subtropicais. A distribuição e papel dos IGFs nos testículos de peixes foram pouco explorados quando comparados com ovários, o que resulta em um maior entendimento do papel dos IGFs na foliculogênese em relação a espermatogênese

Espécie de estudo

A espécie *Hypostomus garmani* é um siluriforme da bacia do Rio São Francisco, pertencente à família Loricariidae. Os representantes dessa família são conhecidos como cascudos e apresentam o corpo recoberto por placas dérmicas ósseas e boca situada ventralmente com lábios alargados em forma de ventosa, modificada para raspar algas e se prender ao substrato (Casatti and Castro 1998). O gênero *Hypostomus* possui o maior número de espécies dentro da ordem Siluriformes sendo amplamente distribuído pelas bacias hidrográficas da América Central e do Sul. Alguns de seus representantes possuem importante valor comercial para pesca extrativa, aquarismo e são utilizados na alimentação de populações ribeirinhas. A maioria das espécies desse gênero possuem corpo achatado dorsoventralmente e nadadeiras peitorais bem desenvolvidas para se prender e locomover em substratos rochosos (Garavello and Garavello 2004). Os *Hypostomus* habitam águas límpidas no leito rochoso dos rios, ou água barrenta de fundo arenoso, podem suportar a presença de barramentos e se adaptar a reservatórios (Garavello and Garavello 2004; Duarte et al. 2011). O cascudo *H. garmani* é uma espécie encontrada principalmente nas calhas do Rio São Francisco e Rio das Velhas, os adultos apresentam hábito noturno e alimenta-se de algas perifíticas presas as rochas, desempenhando papel importante na ciclagem de nutrientes (Casatti and Castro 1998). Embora *H. garmani* tenha distribuição ao longo da Bacia do Rio São Francisco, estudos sobre a reprodução e gametogênese dessa espécie não foram realizados.



Figura 3: Exemplar macho de *Hypostomus garmani*. Comprimento médio: 23cm.

Área de estudo

O Rio das Velhas, com aproximadamente 761 quilômetros de extensão, é o maior afluente em extensão da bacia do Rio São Francisco. Sua nascente está localizada no município de Ouro Preto e deságua no Rio São Francisco, no distrito de Barra do Guaicuy, município de Várzea da Palma, Minas Gerais (Poligano et al. 2001). O alto Rio das Velhas está localizado no quadrilátero ferrífero, compreende a porção entre os municípios de Ouro Preto e Belo Horizonte, drenando a terceira maior região metropolitana do Brasil. A região tem importância ecológica por estar em uma área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado, ambos classificados como *hotspots* de biodiversidade mundial por conter muitas espécies endêmicas sob forte ameaça da perda de habitat (Myers et al. 2000; Pompeu and Alves 2005). As principais atividades de uso e ocupação do solo nessa região incluem campos de pastagem, mineração e urbanização (Poligano et al. 2001). Entretanto, existem áreas onde a vegetação ciliar é abundante e o Rio das Velhas bem preservado com trechos de remanso que se intercalam com várias corredeiras e rochas que afloram em vários pontos do leito do rio, onde habitam espécies de cascudos como *H. garmani*. Apesar de sua relevância ecológica, poucos estudos sobre gametogênese e reprodução de peixes foram realizados na região do alto Rio das Velhas (Veloso-Júnior et al. 2009; Melo et al. 2017; Weber et al. 2017).

Justificativa

Estudos sobre a biologia reprodutiva e a cascata de eventos moleculares que ocorrem durante a gametogênese e maturação gonadal são importantes, pois levantam informações que podem ser aplicadas à criação comercial de peixes e à conservação da biodiversidade (Wildt and Wemmer 1999). Poucas informações estão disponíveis na literatura no que diz respeito a expressão celular dos IGFs ao longo de um ciclo reprodutivo de uma espécie de peixe, especialmente relacionando a expressão dessas moléculas com a dinâmica de proliferação e morte celular. Isso limita o entendimento da regulação e controle da gametogênese e maturação gonadal de peixes teleósteos. No presente trabalho, utilizamos o cascudo *H. garmani* como modelo de estudo da espermatogênese. Esta espécie é um típico representante da família Loricariidae, um grupo importante do ponto de vista comercial e ecológico dentre os Siluriformes neotropicais. Este estudo faz parte de um projeto que tem por objetivo investigar a reprodução e gametogênese de peixes da região do alto Rio das Velhas em seus aspectos morfofuncionais, mecanísticos e suas possíveis implicações ecológicas. Apesar de sua importância ecológica e potencial para criação em escala comercial, estudos sobre a biologia reprodutiva e gametogênese de *H. garmani* não foram ainda realizados. Dessa forma, o presente trabalho buscou agregar novas informações sobre a reprodução de *H. garmani* e sobre o papel de IGF1 e IGF2 na dinâmica de crescimento e recrudescência testicular de peixes teleósteos.

Objetivos

Objetivo geral

Analisar a biologia reprodutiva e gametogênese de *Hypostomus garmani* no alto Rio das Velhas, com ênfase na expressão de IGF1, IGF2 e biomarcadores de proliferação e morte celular nas diferentes fases de maturação testicular.

Objetivos específicos

Capítulo 1

Avaliar os principais parâmetros reprodutivos de *H. garmani* na região do alto Rio das Velhas com ênfase na gametogênese de fêmeas, relacionando as informações obtidas com as estratégias reprodutivas dos lorícarídeos.

Capítulo 2

Analisar a expressão de IGF1 e IGF2 durante a espermatogênese de *H. garmani* e relacionar com a dinâmica de proliferação e morte celular nas diferentes fases da maturação testicular.

Capítulo 1

Artigo 1 a ser submetido

Biologia Reprodutiva de *Hypostomus garmani* no alto Rio das Velhas, Bacia do Rio São Francisco, Brasil

Introdução

A região Neotropical é conhecida por possuir a mais rica ictiofauna de água doce do mundo, com cerca de 6.000 espécies, das quais aproximadamente a metade delas é encontrada no Brasil (Reis et al. 2003; Albert et al. 2011). Parâmetros da biologia reprodutiva como época de reprodução e desenvolvimento gonadal são essenciais para obter uma compreensão abrangente da dinâmica populacional de uma espécie de peixe em seu habitat. Além disso, os conhecimentos gerados por estudos sobre a reprodução de peixes podem ser aplicados a criação comercial e conservação da ictiofauna (Winemiller, 1989, Wootton, 1989). Apesar da biodiversidade, a maioria das espécies de peixes neotropicais é pouco conhecida, pouco explorada e o conhecimento da biologia reprodutiva é limitado principalmente as espécies de importância comercial.

Ao longo da evolução, os peixes desenvolveram uma grande variedade de estratégias reprodutivas para colonizar diversos tipos de ambientes e garantir a preservação da espécie (Coward et al. 2002). As estratégias reprodutivas dos animais permitem otimizar a relação entre gasto energético da reprodução e o aumento da expectativa de vida da prole, até que esta atinja a fase adulta e possa reproduzir (Wootton, 1984; Roff, 1992; Pianka, 2000). Em relação aos peixes de água doce da América do Sul, Winemiller (1989) reconheceu um contínuo entre três estratégias reprodutivas básicas: estratégia oportunista, que engloba peixes de colonização rápida, maturação gonadal precoce, desova continua com alta fecundidade e baixa sobrevivência dos juvenis; estratégia de equilíbrio, caracterizada pela presença de cuidado parental, desova sazonal ou contínua com baixa fecundidade e alta sobrevivência dos juvenis; e estratégia sazonal, caracterizada pela desova sincronizada com a estação chuvosa, migração reprodutiva, ausência de cuidado parental e alta fecundidade.

A produção dos gametas é um evento complexo e organizado regulado por gonadotrofinas, esteroides sexuais e fatores de crescimento (Schulz et al., 2010). Durante gametogênese, ovogônias e espermatogônias diploides proliferam e gradativamente se diferenciam para formar células germinativas haploides. (Lubzens et al., 2010). A morfologia macro e microscópica das gônadas permite avaliar a biologia e desenvolvimento dos gametas e são importantes para identificar o início da maturidade

sexual, maturação gonadal, fecundidade e os ritmos de desova (Bazzoli 2003; Parenti and Grier, 2004). O índice gonadossomático (IGS) associado a análise histológica das gônadas é frequentemente usado na determinação do ciclo reprodutivo e período de desova dos peixes (Grier and Taylor 1998). O fator de condição de Fulton (K) indica a condição fisiológica do peixe em seu habitat, refletindo a interação entre fatores bióticos e abióticos os quais variam durante o ciclo reprodutivo (Lima-Junior R. 2006).

Estudos comparativos da gametogênese de peixes demonstram forte relação entre a morfologia dos folículos ovarianos e as estratégias reprodutivas das espécies (Suzuki et al. 2000; Martins et al. 2010; Melo et al. 2011). De acordo com estes autores características morfológicas dos folículos maduros e suas camadas envoltórias, zona radiata e células foliculares, estão relacionadas ao habitat de desova e a presença ou ausência de cuidado parental. Além disso, a duração do período reprodutivo e a fecundidade são características que apresentam relação com o tipo e frequência da desova (Sato et al. 2003; Suzuki et al. 2000).

A família Loricariidae apresenta o maior número de espécies dentre os Siluriformes. As espécies desse grupo exibem uma grande variedade de estratégias reprodutivas relacionadas ao meio ambiente e são amplamente distribuídas pelas bacias hidrográficas da América Central e do Sul (Suzuki et al. 2000). Os representantes dessa família são conhecidos como cascudos (armored catfishes) e apresentam o corpo recoberto por placas dérmicas ósseas e boca situada ventralmente com lábios alargados em forma de ventosa, modificada para raspar algas e se prender ao substrato (Casatti and Castro 1998). O gênero *Hypostomus* é o maior gênero dentro da família Loricariidae, com aproximadamente 130 espécies reconhecidas e algumas espécies são importante fonte de proteína para populações ribeirinhas (Zawadzki et al. 2010). Os *Hypostomus* habitam águas límpidas no leito rochoso dos rios (Garavello and Garavello 2004), ou água barrenta de fundo arenoso, podem suportar a presença de barramentos e se adaptar a reservatórios (Duarte et al. 2011). O cascudo *Hypostomus garmani* é uma espécie da bacia do Rio São Francisco, apresenta hábito noturno, alimenta-se de algas perifíticas presas as rochas e por isso desempenha papel importante na reciclagem de nutrientes (Casatti and Castro 1998).

O rio das Velhas é o maior afluente do rio São Francisco e sua parte superior drena a região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, a terceira maior região do Brasil. O alto Rio das Velhas tem importância ecológica por estar em uma área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado, ambos classificados como *hotspots*

de biodiversidade mundial por conter muitas espécies endêmicas sob forte ameaça da perda de habitat (Myers et al. 2000; Pompeu and Alves 2005). Apesar de sua relevância ecológica, poucos estudos de gametogênese e reprodução de peixes foram desenvolvidos no alto Rio das Velhas (Veloso-Júnior et al. 2009; Melo et al. 2017; Weber et al. 2017).

Embora *H. garmani* tenha distribuição ao longo da bacia do São Francisco, estudos sobre a biologia reprodutiva dessa espécie não foram realizados. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os principais parâmetros reprodutivos e a gametogênese de *H. garmani* na região do alto Rio das Velhas, relacionando as informações obtidas com as estratégias reprodutivas de loricarídeos.

Material e métodos

Amostragem de peixes

A coleta dos peixes seguiu os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o estudo foi aprovado pelo Comitê de ética sobre uso de animais (CEUA, protocolo N° 189) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Um total de 92 fêmeas e 103 machos de *H. garmani* foram coletados trimestralmente durante um ciclo reprodutivo em um trecho (20°8'54 a 20°5'58S e 43°47'33 a 43°47'35W) do alto Rio das Velhas, sudeste do Brasil, com auxílio de redes de emalhar tendo 1,5 a 6 cm entre nós opostos. Espécimes-testemunho foram catalogados e tombados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP 107508). De cada exemplar, os seguintes dados biométricos foram obtidos: comprimento total (TL), peso corporal (W) e peso das gônadas (PG) e os índices gonadossomático (IGS=100PG/PC) e fator de condição de Fulton ($K=100PC/CT^3$) foram calculados. A relação peso-comprimento foi determinada usando a fórmula $W = a (TL)^b$, onde, “a” é o coeficiente de peso e “b” é o coeficiente alométrico (Froese 2006). Durante as coletas, os principais parâmetros físico-químicos da água (condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, pH e temperatura) foram mensurados utilizando-se uma sonda multiparâmetro modelo Horiba U5.

Análises histológicas, histoquímicas e morfometria

Em campo, os espécimes foram dissecados, e seções transversais das gônadas de cada exemplar foram fixadas em líquido de Bouin por 8 h a temperatura ambiente, e conservadas em solução de álcool 70%. Em laboratório, as amostras foram embebidas

em parafina, seccionadas com 5µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina. As seguintes técnicas histoquímicas foram utilizadas para detecção de carboidratos: ácido periódico de Schiff (PAS), Alcian Blue (AB) pH 2,5 e AB pH 0,5. Baseado na distribuição das células germinativas nas gônadas, os seguintes estádios de maturação gonadal foram estabelecidos: repouso, maturação, maduro e desovado/espermiado (Rizzo and Bazzoli 2014). O diâmetro dos folículos vitelogênicos maduros, a altura da zona radiata e células foliculares foram medidos (n=100) usando um sistema de análise de imagens Zeiss (Axio Vision SE64) acoplado a microscópio de luz. A proporção relativa de folículos ovarianos (%) foi determinada no estádio maduro.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad versão 5, San Diego California USA. Após teste de normalidade (Lilliefors test), os parâmetros da água e as médias de IGS e K foram analisadas usando o teste Kruskal-Wallis (H) seguido pelo pós-teste de Dunn. O teste Mann-Whitney foi utilizado para verificar se existe dimorfismo sexual em tamanho. Para analisar as proporções dos estádios de maturação gonadal nos períodos amostrados foi utilizado o Teste G e o coeficiente de Correlação de Spearman foi calculado para se verificar a correlação entre a temperatura da água e o IGS ao longo do ciclo reprodutivo. Os dados obtidos foram expressos em média ± erro padrão e foram considerados significantes com $p < 0,05$.

Resultados

Parâmetros físico-químicos da água do Rio das Velhas

A temperatura variou entre 16 a 22°C e foi significativamente maior em dezembro e março (H=38,1; $p < 0,001$) (Table 1). Concentrações de oxigênio dissolvido acima de 8 mg/L ocorreram em todos os períodos. Os menores valores de oxigênio dissolvido (H=31,3; $p < 0,001$) e condutividade elétrica (H=31; $p < 0,001$) foram registradas em dezembro e março. O pH variou de 5,86 a 7,01 e foi maior em dezembro (H=16; $p < 0,001$) (Table 1).

Distribuição dos peixes por classe de tamanho e maturação das gônadas

O comprimento total das fêmeas de *H. garmani* variou de 14,7 a 30,2 cm com média de $22,3 \pm 2,9$ cm. Os machos apresentaram comprimento total entre 10 a 34,5 cm com média de $22,9 \pm 4,4$ cm. Não houve diferença significativa entre as médias de comprimento total de machos e fêmeas ($U = 3831$; $p = 0,3$). A distribuição das frequências dos peixes por classe de tamanho mostrou que a maioria dos peixes apresentaram de 20 a 24,9 cm CT (Table 2). Os menores peixes nos estádios de maturação e maduro apresentaram entre 15 e 19,9 cm CT. Machos espermiados foram encontrados a partir dos 10 cm. A relação peso-comprimento observada apresentou o parâmetro b próximo a 2 em ambas os sexos, com um ligeiro aumento para os machos (Fig 1). A proporção sexual observada foi de 1.2 machos para cada fêmea.

Estádios de maturação gonadal e características morfológicas dos folículos vitelogênicos

Ovários em repouso (Fig 2a) apresentaram lamelas ovarianas contendo ninhos de ovogônias e folículos perinucleolares iniciais e avançados. Na maturação (Fig 2b) foram encontrados folículos perinucleolares, pré-vitelogênicos com vesículas corticais e alguns folículos em início da vitelogênese. Ovários maduros (Fig 2c) apresentaram folículos perinucleolares inicial ($49,4 \pm 14,3$ %) e avançado ($20,1 \pm 6,3$ %), folículos pré-vitelogênicos com vesículas corticais ($6,4 \pm 3,1$ %) e folículos vitelogênicos ($24,1 \pm 9,9$ %). O estágio desovado (Fig 2d-e) apresentou folículos perinucleolares, alguns folículos pré-vitelogênicos com vesículas corticais e vitelogênicos, folículos pós-ovulatórios e atresícos em diferentes fases de regressão.

Folículos vitelogênicos maduros apresentaram grande diâmetro ($2443,6 \pm 432,86$ μm), zona radiata espessa ($5,19 \pm 1,34$ μm) e células foliculares colunares ($29,62 \pm 10,04$ μm) (Fig 2f). A zona radiata foi PAS-positiva indicando a presença de glicoproteínas neutras. Vesículas corticais foram AB pH 2,5-positivos indicando a presença de glicoconjugados ácidos carboxilados. Células foliculares apresentaram reação positiva para PAS e AB pH 2,5 devido a presença de ambas substâncias. Nenhuma dessas estruturas foram positivas ao AB pH 0,5.

Testículos de *H. garmani* foram do tipo tubular anastomosado com distribuição irrestrita de espermatogônias. Testículos em repouso (Fig 2i) apresentaram túbulos seminíferos contendo apenas espermatogônias e lumes fechados. Nos testículos em maturação (Fig 2j), foram encontrados túbulos com cistos de células germinativas em

diferentes fases de desenvolvimento e pequena quantidade de espermatozoides no lúmen. Em testículos maduros (Fig 2k), os lúmens dos túbulos seminíferos estavam repletos de espermatozoides, podendo conter também cistos de células da linhagem espermatogênica. Testículos espermiados (Fig 2l) apresentaram-se hemorrágicos, túbulos seminíferos com lúmens abertos, contendo espermatozoides e cistos de células espermatogênicas residuais.

Frequência dos estádios de maturação gonadal e variações do IGS e K

Fêmeas em repouso de *H. garmani* foram encontradas em todos os períodos amostrados, com frequência em torno de 20% em cada período (Fig 3a). Fêmeas em maturação predominaram em junho (teste $G=44,8$; $p<0,001$), enquanto fêmeas maduras foram observadas em baixa quantidade em junho e elevadas proporções em setembro e dezembro (teste $G=21,5$; $p<0,001$). O estágio desovado foi encontrado em dezembro e março. Os valores de IGS foram significativamente mais elevados em dezembro ($H=12,5$; $p=0,006$), enquanto o K foi mais elevado em junho e setembro ($H=17,13$; $p<0,001$) (Fig 4a-b). Não houve correlação significativa entre os valores do IGS ($r=0,39$; $p=0,34$) e K ($r=-0,50$; $p=0,13$) das fêmeas com as temperaturas da água do Rio das Velhas.

Machos em repouso foram capturados em todos os períodos amostrados, com elevada frequência em março (teste $G=9,14$; $p=0,002$) e junho (teste $G=48,41$; $p<0,001$) (Fig 3b). O estágio maduro foi observado apenas em setembro e dezembro. Machos espermiados predominaram em dezembro (teste $G=19,5$; $p<0,001$) e não foram observados em setembro. O IGS foi maior em setembro com pico em dezembro ($H=12,5$; $p=0,006$) (Fig 4a), períodos com elevada proporção de animais com testículos maduros. O K apresentou padrão similar ao observado nas fêmeas com elevadas médias em junho e setembro ($H=26,4$; $p<0,001$) (Fig 4b). Os valores de IGS dos machos *H. garmani* e a temperatura da água do Rio das Velhas apresentaram correlação positiva ($r=0,92$; $p=0,001$), indicando que o aumento do IGS acompanha o aumento da temperatura da água. Assim como nas fêmeas, os valores de K não apresentaram correlação significativa com a temperatura da água ($r=-0,58$; $p=0,12$).

A distribuição das frequências dos estádios de maturação gonadal mostrou que a atividade reprodutiva (estádios maturação, maduro e desovado/espermiado) de *H. garmani* ocorreu ao longo de todo o ano, com desova concentrada em dezembro e março.

Discussão

Os dados do presente trabalho determinam pela primeira vez os principais parâmetros reprodutivos de *H. garmani* em um ambiente natural. As classes de tamanho registradas sugerem que a atividade reprodutiva dos machos ocorre a partir dos 10 cm enquanto as fêmeas iniciam a partir dos 15 cm. O parâmetro b da relação-peso comprimento foi próximo de 2 em ambos os sexos, o que indica crescimento alométrico negativo, ou seja, essa espécie possui forma corporal mais alongadas, semelhante a outros loricarídeos (Froese 2006; Mereles et al. 2017). Embora machos apresentaram maior amplitude de comprimento total do que as fêmeas, nossos resultados mostram que não houve diferença significativa em relação ao tamanho entre os sexos, indicando ausência de dimorfismo sexual em comprimento para *H. garmani*. Em contraste, fêmeas de *Loricariichthys castaneus* (Gomes et al. 2011) e *Hypostomus affinis* (Duarte et al. 2011), alcançaram maiores tamanhos em relação aos machos. Para a maioria dos teleósteos, observa-se que machos são menores que as fêmeas, o que reflete o maior investimento reprodutivo das fêmeas, que podem produzir mais ovos. Tal estratégia está associada à seleção em direção a maior fecundidade (Lowe-McConnell 1963). Por outro lado, os machos maiores estão associados ao territorialismo, cuidado parental e à competição por habitat, atraindo fêmeas para reprodução (Power 1984).

O período de desova da espécie estudada concentrou-se entre os meses de dezembro e março, período chuvoso e com elevada temperatura da água no sudeste do Brasil. Populações nativas de *Hypostomus francisci* (Sales et al. 2016) e *Hypostomus ancistroides* (Viana et al. 2008) também apresentaram sazonalidade bem definida, concentradas entre os meses de novembro e janeiro. No entanto, a espécie *Hypostomus niceforoi* apresentou atividade reprodutiva durante quase todo o ano (Cook-Hildreth et al. 2016) o que demonstra variação no comportamento reprodutivo para as espécies do gênero *Hypostomus*, provavelmente relacionada a diferentes condições ambientais.

O IGS é considerado um bom indicador do período reprodutivo, uma vez que a proliferação e desenvolvimento das células germinativas acarretam no aumento do peso das gônadas (Grier and Taylor 1998). De fato, nossos resultados mostraram maiores valores de IGS em setembro e principalmente em dezembro (IGS= 3,4 para fêmeas e 0,14 para machos) devido a maior proporção de peixes em maturação e maduro em ambos os sexos. *H. garmani* apresentou fêmeas e machos com baixos valores de IGS quando comparadas com outras espécies como *Hypostomus pusalum*, que apresentou

IGS aproximadamente igual a 12 para fêmeas e 8 para machos (Pessoa et al. 2013), provavelmente devido a diferenças na fecundidade.

Em *H. garmani*, os valores de K sugerem uma relação entre este índice e o desenvolvimento das gônadas. O período de desova levou a uma depleção nos valores de K, mas essa perda foi repostada no período pós-desova, junho e setembro. Padrão semelhante foi observado em *Rhinelepis aspera* (Agostinho et al. 1990) e *H. pusalum* (Pessoa et al. 2013) onde os maiores valores de K foram observados quando o IGS era baixo e as gônadas estavam em repouso ou em início de maturação, como observado nos nossos resultados. De acordo com Gurgel (2004) a redução do K durante o período reprodutivo pode ser explicada pelo uso das reservas energéticas no processo de desenvolvimento das gônadas e nos eventos de desova.

Em loricarídeos, o tipo de desova varia entre espécies. Desova do tipo total foi observada em *Hypostomus ternetzi* e *R. aspera* (Suzuki et al. 2000), enquanto desova parcelada foi registrada para *H. affinis* (Mazzoni and Caramaschi 1997), *L. castaneus* (Gomes et al. 2011) e *Loricariichthys platymetopon* (Suzuki et al. 2000). A presença de ovários maduros contendo folículos em várias fases de desenvolvimento e ovários desovados contendo folículos pós-ovulatórios associados a folículos em desenvolvimento encontrados em nosso trabalho, é um indicativo de que *H. garmani* possui desenvolvimento assincrônico de folículos e desova do tipo parcelada concentrada no período chuvoso. Tais fatos observados em conjunto, confirmam a grande variedade de estratégias reprodutivas adotadas pelas espécies deste grupo.

Em peixes, o diâmetro dos ovócitos vitelogênicos pode estar relacionado ao comportamento de cuidado com a prole (Melo et al., 2011; Vazzoler, 1996). Segundo Nakatami et al. (2001) espécies que apresentam folículos vitelogênicos grandes geralmente exibem longo período de desenvolvimento larval e cuidado parental, enquanto espécies que possuem folículos pequenos possuem rápido desenvolvimento e não apresentam comportamento de cuidado com a prole. Além de apresentarem folículos vitelogênicos grandes, as espécies com cuidado parental possuem baixa fecundidade em relação as espécies sem este comportamento (Sato et al., 2003). Espécies como *H. francisci* (Sales et al. 2016) e *H. pusalum* (Macedo et al. 2017) apresentaram baixa fecundidade e o diâmetro dos folículos vitelogênicos foram semelhantes aos observados em *H. garmani*. Suzuki et al. (2000) estudando loricarídeos do Rio Paraná, Brasil, observou que para as espécies que apresentaram ovócitos vitelogênicos grandes e em baixa quantidade, os machos exibiam algum tipo de cuidado

parental. Assim, tais observações podem indicar que essas espécies investem na produção de poucos ovos com grande quantidade de vitelo, garantindo assim, elevadas taxas de sobrevivência da prole. Espécies com tais características se relacionam a estratégia de equilíbrio (tendência K-estrategista), enquanto espécies com ovos pequenos, alta fecundidade e sem cuidado com a prole se relacionam a estratégia oportunista (tendência R-estrategista) (Winemiller and Rose 1992). Interessantemente, *H. affinis* pode alterar alguns padrões reprodutivos de acordo com o ambiente em que está inserido, i.e, diminuindo o tamanho do ovócito e aumentando a fecundidade quando habita ambientes lênticos. Além disso, as fêmeas de *H. affinis* alcançam tamanhos maiores do que os machos e passam a ter desenvolvimento de ovócitos do tipo sincrônico em grupo (Duarte et al. 2011).

Nos peixes teleósteos, características das camadas envoltórias do folículo como espessura da zona radiata, conteúdo e formato das células foliculares refletem adaptações a diferentes condições ecológicas (Stehr and Hawkes 1979; Fausto et al. 2004). Uma das funções da zona radiata é proteger o ovo contra agentes externos e danos ao desenvolvimento do embrião e em alguns casos, a adesão do ovo ao substrato. Ovos demersais tendem a ter zona radiata mais espessa que ovos pelágicos o que confere maior proteção contra choques mecânicos (Riehl and Patzner 1998). Os folículos vitelogênicos de *H. garmani* apresentaram espessa zona radiata semelhante a outras espécies de loricarídeos como *H. ternetzi* e *Megalancitrus aculeatus* que são conhecidas por desovarem em substratos rochosos (Suzuki et al. 2000). As células foliculares colunares têm maior capacidade de sintetizar mucosubstâncias que são liberadas na superfície ovocitária sendo responsável por permitir a adesão dos ovos, o que facilita o cuidado parental (Melo et al. 2011). As glicoproteínas neutras associadas com glicoconjugados ácidos carboxilados observados nas células foliculares de *H. garmani*, podem formar mucosubstâncias como observado em *L. alexandre* e *R. aspera* (Melo et al. 2011). Em conjunto, os folículos vitelogênicos e o conteúdo histoquímico das camadas envoltórias de *H. garmani* também foram semelhantes aos da espécie congênere *H. francisci* que é conhecida por possuir ovos adesivos, desovar em substratos rochosos e exibir comportamento de cuidado parental (Garavello and Garavello 2004; Sales et al. 2016). De fato, a região de estudo compreende sequências de corredeiras, com fluxo de água turbulento, ao longo da calha rochosa do rio. Assim nossos resultados sugerem que *H. garmani* possui ovos adesivos e desova em substratos rochosos onde os ovos podem sofrer abrasão.

Em relação à morfologia dos testículos, *H. garmani* apresentou testículos do tipo tubular anastomosado, no qual os compartimentos germinais são interconectados em toda a gônada, similar ao reportado em outros siluriformes (Melo et al. 2011, 2017) . Os testículos apresentaram características semelhantes a outros loricarídeos com células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento nos túbulos seminíferos. As células espermatogênicas foram organizadas em cistos, delimitados por extensões citoplasmática das células de Sertoli, contendo apenas células no mesmo estágio de diferenciação. Além disso, a distribuição das espermatogônias foi do tipo irrestrita, apresentando-se ao longo de todo o testículo, característica comum aos Cypriniformes, Characiformes, Salmoniformes e outras espécies de Siluriformes (Parenti and Grier 2004; Nóbrega et al. 2009).

Os resultados do presente estudo demonstram que o período da desova de *H.garmani* se estende de dezembro a março com desova do tipo parcelada. Nós observamos também que as características morfológicas dos folículos ovarianos condizem com as de espécies que desovam em ambientes sujeitos a abrasão, possuem cuidado parental e se aproximam da estratégia de equilíbrio. Neste sentido, é de extrema importância a conservação das características naturais do Rio das Velhas, uma vez que espécies como *H. garmani*, se mostram altamente adaptada as condições naturais deste rio.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos da água no alto Rio das Velhas.

| | Temperatura (°C) | Oxigênio (mg/L) | pH | Condutividade (mS/cm) |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Março | 20,93 ± 0,17 ^a | 9,90 ± 1,02 ^b | 6,50 ± 0,45 ^b | 0,05 ± 0,009 ^b |
| Junho | 16,31 ± 0,50 ^b | 12,14 ± 1,04 ^a | 6,61 ± 0,28 ^b | 0,08 ± 0,002 ^a |
| Setembro | 18,00 ± 0,80 ^b | 10,98 ± 0,61 ^{ab} | 6,58 ± 0,31 ^b | 0,08 ± 0,005 ^a |
| Dezembro | 21,30 ± 0,62 ^a | 8,80 ± 1,70 ^{bc} | 7,07 ± 0,33 ^a | 0,07 ± 0,01 ^{ab} |

Dados obtidos de junho de 2014 a março de 2015. Valores representam média ± erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os períodos. Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

Tabela 2: Distribuição do *Hypostomus garmani* por classe de comprimento total por estágio do ciclo reprodutivo capturados no alto Rio das Velhas.

| | Classe de comprimento (cm) | Repouso | Maturação | Maduro | Desovado Espermiado | Total |
|---------------|-------------------------------|---------|-----------|--------|------------------------|-------|
| Fêmeas | 10 – 14,9 | 1 | - | - | - | 1 |
| | 15 – 19,9 | 9 | 4 | 1 | - | 14 |
| | 20 – 24,9 | 12 | 20 | 22 | 9 | 63 |
| | 25 – 29,9 | 2 | 6 | 2 | 3 | 13 |
| | 30 – 34,9 | - | - | 1 | - | 1 |
| Total | | 24 | 30 | 26 | 12 | 92 |
| Machos | 10 – 14,9 | 2 | - | - | 3 | 5 |
| | 15 – 19,9 | 9 | 3 | 3 | - | 15 |
| | 20 – 24,9 | 28 | 7 | 8 | 8 | 51 |
| | 25 – 29,9 | 14 | 3 | 2 | 9 | 28 |
| | 30 – 34,9 | 1 | 1 | - | 2 | 4 |
| Total | | 54 | 14 | 13 | 22 | 103 |

Dados obtidos de junho de 2014 a março de 2015.

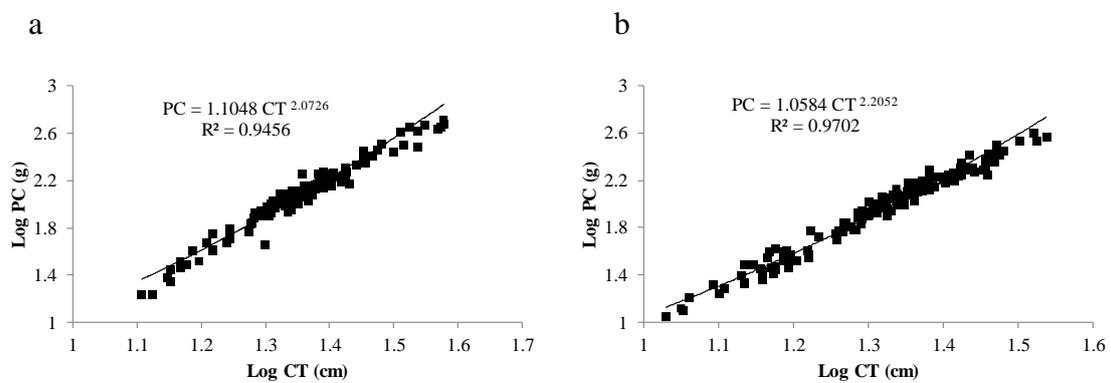
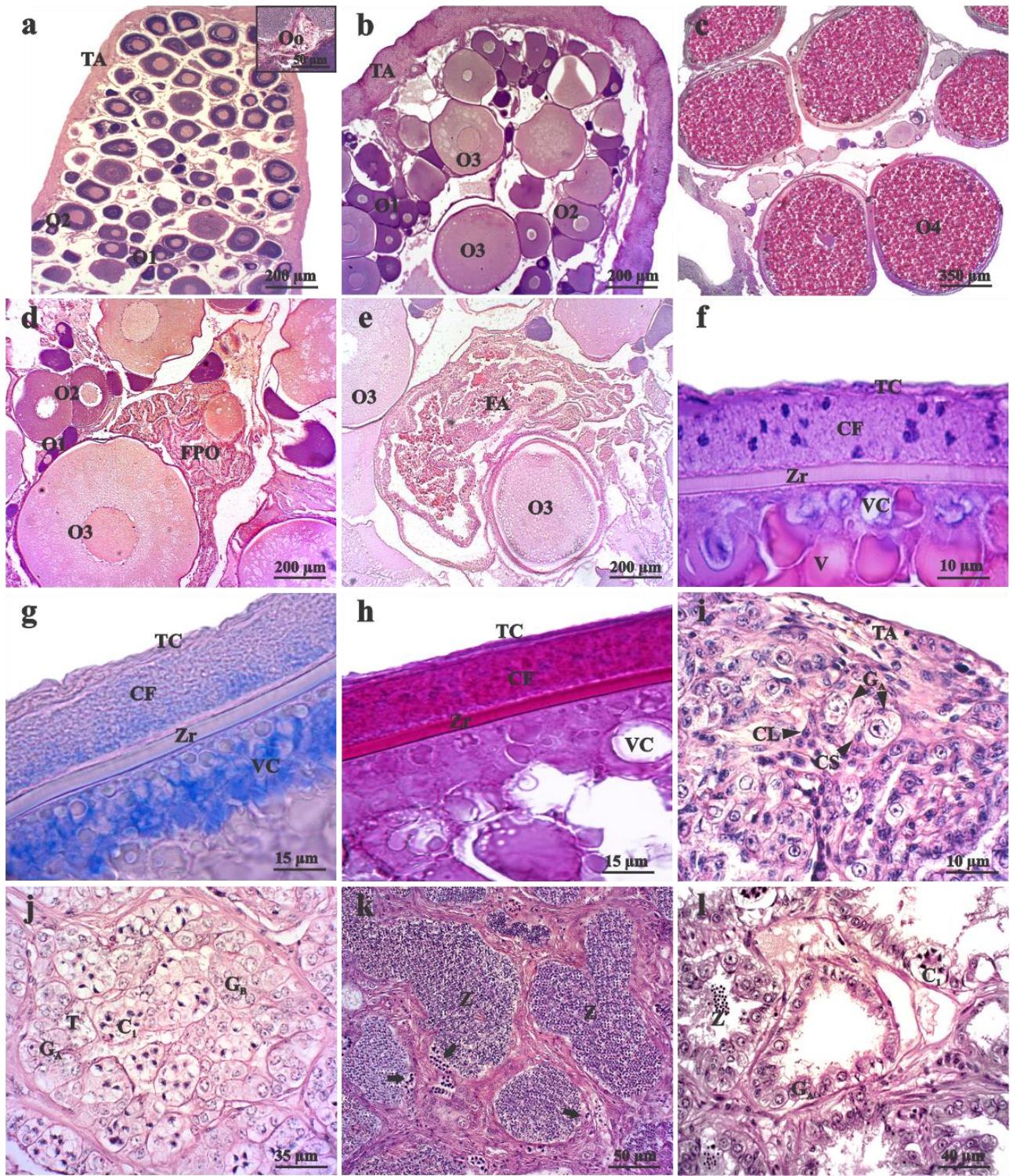


Figura 1 – Relação peso-comprimento de fêmeas (a) e machos (b) de *Hypostomus garmani* do alto Rio das Velhas. PC: peso corporal, CT: comprimento total.

Figura 2 - Secções histológicas das gônadas de *Hypostomus garmani* corados com hematoxilina-eosina (a-f, i-l), alcian blue ph 2,5 (g) e ácido periódico de Schiff (PAS) (h). **a** Ovário em repouso delimitado por espessa túnica albugínea (TA) contendo apenas folículos perinucleolares iniciais (O1), avançados (O2) e ninho do ovogônias (Oo – incart) ; **b** Ovário em maturação mostrando folículos pré-vitelogênicos com vesículas corticais (O3); **c** Ovário maduro com folículos vitelogênicos (O4); **d** Ovário desovado contendo folículos pós-ovulatórios (FPO) e folículos em desvolvimento; **e** Ovário mostrando folículo vitelogênico em atresia (FA); **f** Detalhe de folículo vitelogênico mostrando teca (TC), células foliculares prismáticas (CF), zona radiata (ZR), vesícula cortical (VC) e glóbulos de vitelo (V); **g** Folículo vitelogênico apresentando CF e VC Alcian Blue pH 2,5 positivos; **h** CF e ZR de folículo vitelogênico mostrando reação positiva ao PAS; **i** Testículo em repouso revestido por TA mostrando túbulos seminíferos fechados contendo apenas espermatogônias tipo A (G_A) envolvidas por células de Sertoli (CS). Células de Leydig (CL) podem ser observadas no interstício; **j** Túbulo seminífero em maturação inicial contendo cistos de G_A , espermatogônias tipo B (G_B), espermatócitos primários (C_1) e espermátides (T); **k** Testículo maduro com túbulos seminíferos repleto de espermatozoides (Z) e discreto epitélio germinativo (setas); **l** Testículo espermiado com túbulos vazios contendo Z residuais e epitélio germinativo com G_A e alguns cistos de C_1 .



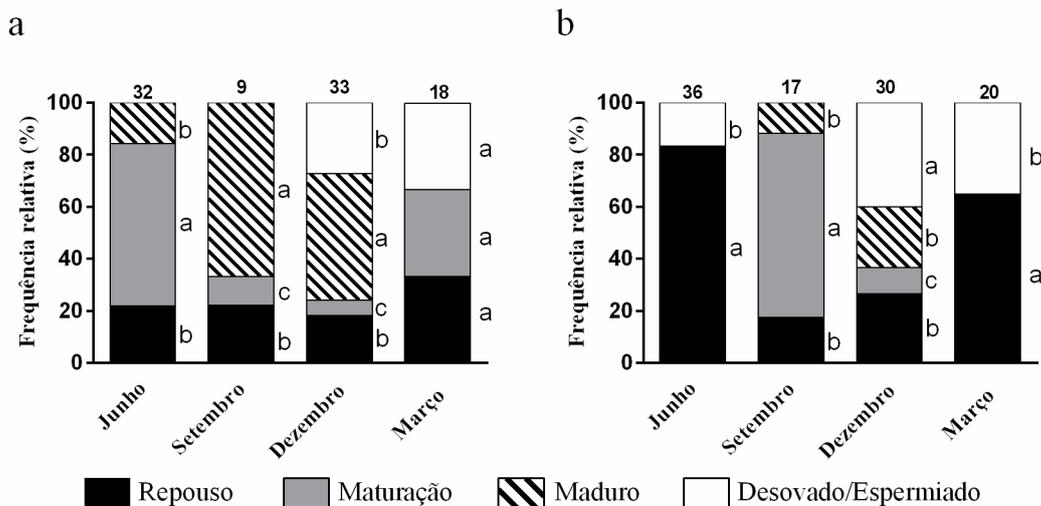


Figura 3 - Proporção (%) dos estádios de maturação gonadal de fêmeas (a) e machos (b) de *Hypostomus garmani* do alto Rio das Velhas entre junho/2014 e março/2015. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as proporções no período. Teste G; $P < 0,05$. Os números acima das barras indicam o tamanho da amostra.

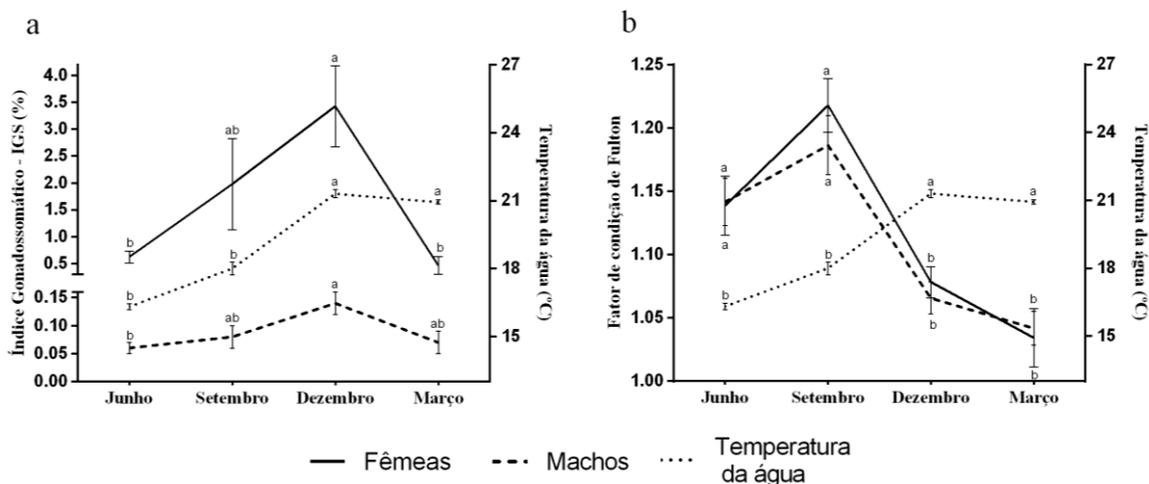


Figura 4 – Variações do Índice gonadosomático (a), Fator de condição e Fulton (b) de fêmeas e machos de *Hypostomus garmani* e temperatura da água do alto Rio das Velhas entre junho/2014 e março/2015. Valores representam média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias do período. Kruskal-Wallis; $P < 0,05$.

Capítulo 2

Artigo 2 a ser submetido

Proliferação, morte celular e expressão de IGF1 e IGF2 durante a espermatogênese e maturação testicular de *Hypostomus garmani*.

Introdução

A espermatogênese é um processo complexo e dinâmico que envolve a proliferação e diferenciação de espermatogônias diploides em espermatozoides haploides, o que requer uma rede de interações entre células e hormônios, bem organizada no espaço e no tempo (Griffeth et al. 2014). Assim como em outros vertebrados, as gonadotrofinas FSH e LH são os principais hormônios reguladores da espermatogênese e esteroidogênese em peixes. Estes hormônios estimulam a produção de esteroides sexuais que atuam na regulação do desenvolvimento gonadal e reprodução. Em teleósteos a 11-ketotestosterona é o principal andrógeno que estimula a espermatogênese e o crescimento testicular (Schulz et al. 2010). Além de gonadotrofinas e esteroides sexuais, outros hormônios, como os fatores de crescimento semelhante a insulina (IGS), possuem ação parácrina/autócrina e estão envolvidos na gametogênese (Duan 1997; Reindl and Sheridan 2012). Dessa forma, o correto funcionamento dos testículos e a fertilidade são regulados pela interação de fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos.

Os IGFs são pequenos polipeptídeos mitogênicos que atuam favorecendo o crescimento e diferenciação em diversos tipos celulares. Nos vertebrados, IGF1 e IGF2 são os principais representantes da família IGF (Reinecke 2010b). Recentemente, foi reconhecido um terceiro tipo, IGF3, que é produzido exclusivamente em gônadas de peixes (Wang et al. 2008). O principal estímulo para a produção e liberação de IGFs é o hormônio do crescimento (GH), que estimula o fígado a produzir os peptídeos que atuam de maneira endócrina por todo o corpo. O GH pode também estimular a síntese de IGFs em outros órgãos, como as gônadas, onde provavelmente estes fatores atuam de maneira parácrina/autócrina modulando a atividade reprodutiva (M. Reinecke, 2010a).

A presença de Igf1 mRNA e/ou o peptídeo IGF1 foi reportado em espermatogônias, espermatócitos, células de Sertoli e Leydig de peixes como truta, tilápia e robalo e lambari (Le Gac et al. 1996; Berishvili et al. 2006; Viñas and Piferrer 2008; Prado et al. 2018). A função de IGF1 é relacionada a esteroidogênese e principalmente a proliferação espermatogonial, bem como sua diferenciação em espermatócitos e inibição da apoptose (Nakayama et al. 1999; Yao et al. 2017). Estudos com IGF2 em testículos são mais escassos, mas a expressão de Igf2 mRNA foi relatada em *Cyprinus*

carpio (Tse et al. 2002), *Oreochromis niloticus* (Caelers et al. 2004), do peptídeo IGF2 em *Astyanax fasciatus* (Prado et al. 2018) e sua deficiência foi relacionada a hipoespermatogênese em humanos (Tang et al. 2016). A maioria dos estudos de expressão de IGFs utilizam mRNA, entretanto a expressão e distribuição dos peptídeos IGF1 e IGF2 nos testículos de peixes foram pouco explorados (Reinecke 2010b).

A dinâmica da proliferação e morte celular das gônadas de peixes varia de acordo com a maturação gonadal e estratégia reprodutiva da espécie (Santos et al. 2008; de Franca et al. 2015). O Ki67 é clássico marcador de proliferação celular sendo uma molécula surfactante que envolve os cromossomos, impedindo sua agregação em uma única massa de cromatina após a desmontagem do envelope nuclear, permitindo a motilidade dos cromossomos e a eficiente interação com o fuso mitótico (Cuylen et al. 2016). Anticorpo contra Ki67 vem sendo utilizado para detectar a expressão dessa proteína em testículos de mamíferos, marcando principalmente espermatogônias e espermatócitos primários (Steger et al. 1998; Mengmeng et al. 2016). Embora a dinâmica de proliferação e morte celular tenha sido explorada em algumas espécies de peixes (Chaves-Pozo et al. 2005; Corriero et al. 2007; Domingos et al. 2013; Ribeiro et al. 2017), poucos estudos abordam os fatores relacionados a esse processo. Além disso, poucas informações estão disponíveis na literatura no que diz respeito a expressão celular de IGF1 e IGF2 ao longo de um ciclo reprodutivo. A espécie *Hypostomus garmani* (Regan, 1904) é um peixe Siluriforme da bacia do Rio São Francisco, Brasil, e popularmente conhecido como cascudo. Este gênero possui o maior número de espécies dentro da ordem Siluriformes sendo amplamente distribuído pelas bacias hidrográficas da América Central e do Sul, e alguns de seus representantes possuem importante valor comercial para pesca extrativista e aquarismo (Garavello and Garavello 2004). Baseado nisso, o objetivo desse trabalho foi analisar a espermatogênese e maturação testicular de *Hypostomus garmani*, com ênfase na expressão das proteínas Ki67, IGF1, IGF2 e da apoptose nas diferentes fases do ciclo reprodutivo.

Metodologia

Amostragem de peixes

A coleta dos exemplares de *H. garmani* seguiu os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o estudo foi aprovado pelo Comissão de ética no uso de animais (CEUA, protocolo N° 189/2015) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Os animais foram coletados

trimestralmente durante um ciclo reprodutivo em um trecho (20°8'54 a 20°5'58S e 43°47'33 a 43°47'35W) do alto Rio das Velhas, sudeste do Brasil, bacia do Rio São Francisco, com auxílio de redes de emalhar (10 m de comprimento, 1,5 m de altura e malhas variando de 1,5 a 6 cm entre nós opostos). Espécimes-testemunho foram catalogados e tombados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP 107508). De cada exemplar, os seguintes dados biométricos foram obtidos: comprimento total (CT), peso corporal (PC), peso das gônadas (PG) e o índice gonadossomático ($IGS=100 PG/PC$) e o fator de condição de Fulton ($K=100 PC/CT^3$) foram calculados.

Histologia

Em campo, os espécimes foram dissecados, e secções transversais das gônadas de cada exemplar foram fixadas em líquido de Bouin por 24 h a temperatura ambiente e conservadas em solução de álcool 70%. Em laboratório, as amostras foram embebidas em parafina, seccionadas com 5µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina. Baseados na distribuição das células germinativas nos túbulos seminíferos, os seguintes estádios de maturação gonadal foram estabelecidos: repouso, maturação, maduro e espermiado (Rizzo and Bazzoli 2014).

Imunohistoquímica

Para imunolocalização de Ki67, IGF1 e IGF2 secções transversais dos testículos foram desparafinizadas, hidratadas gradualmente em solução alcoólica e posteriormente colocadas em banho de água corrente por 1 h para a remoção do fixador. Para reativação antigênica, as secções histológicas foram tratadas com tampão citrato de sódio pH 6.0 a 95°C por 30 min. Albumina sérica bovina (BSA) a 2% e água oxigenada 3% foram utilizadas para bloqueio de reações inespecíficas e da peroxidase endógena, respectivamente. As secções histológicas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários: monoclonal produzido em coelho anti-ki67 humano (diluição 1:100, Sigma-Aldrich, San Louis, USA), policlonal produzido em coelho anti-IGF1 e anti-IGF2 humanos (diluição 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA). Posteriormente, as secções foram incubadas em solução de polímero Dako EnVision+dual link System-HRP (DakoCytomation, Carpinteria, USA) contendo anticorpos secundários anti coelho e camundongo marcados com horsedish peroxidase por 30 min. A reação da peroxidase foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e as

secções foram contracoradas com hematoxilina. Para controle negativo, uma das lâminas não recebeu o anticorpo primário.

Reação de TUNEL

Amostras de testículos foram submetidas à técnica de TUNEL *in situ* utilizando o kit QIA33(TdT-FragEL DNA fragmentation, Calbiochem, San Diego, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Brevemente, as amostras foram desparafinizadas em xilol e lavadas em água corrente por 1 h para remoção do fixador. Posteriormente, as amostras foram tratadas com 20 µg/ml de proteinase K em tampão fosfato salino (PBS) por 20 min e tratadas com água oxigenada 3% em PBS para inativação da peroxidase endógena. As secções foram então incubadas com as enzimas *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) por 1 h a 37°C e posteriormente, com anti digoxigenina conjugado com peroxidase por 30 min. A reação da peroxidase foi revelada com DAB e as secções foram contracoradas com hematoxilina. Para controle negativo, uma das lâminas não recebeu o tratamento com a enzima TdT.

Análises morfométricas

A proporção (%) de células germinativas e células de Sertoli, bem como a quantificação da imunomarcagem e reação de TUNEL, foi determinada por túbulo seminífero em cada estágio de desenvolvimento gonadal com auxílio do software ImageJ 1.4.9 e uma grade de 494 pontos de interseções. Para isso, secções transversais de 30 túbulos seminíferos/estádio, escolhidos aleatoriamente de 5 animais, foram digitalizadas com ampliação de 400X usando um sistema de análise de imagens Zeiss (Axio Vision E64) acoplado a microscópio de luz. De acordo com o diâmetro nuclear e características morfológicas as seguintes células foram avaliadas: espermatogônia tipo A indiferenciada (G_{Aund}), A diferenciada (G_{Adif}) e tipo B (G_B), espermatócito primário (C_1), espermatócito secundário (C_2), espermátide (T), espermatozoide (Z) e célula de Sertoli (SC). O diâmetro nuclear médio das células germinativas foi determinado no aumento de 1000X, medindo-se 100 células em cada fase de desenvolvimento. Para padronizar as análises morfométricas, foram utilizados peixes com tamanho entre 17-28 cm CT e com os maiores valores de IGS em cada estágio de maturação gonadal.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad versão 5, San Diego California USA. Após teste de normalidade, os dados biométricos e morfométricos foram analisados usando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn ou teste Mann-Whitney. Os dados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão e foram considerados significantes com $p < 0,05$. Os estádios de maturação gonadal e a expressão de Ki67, IGF1, IGF2 e marcação por TUNEL em cada tipo celular foram analisados por análise de componentes principais (PCA) para quantificar suas correlações utilizando-se o software Past 3.20.

Resultados

Atividade espermatogênica durante a maturação gonadal

Durante o estágio de repouso dos testículos, os túbulos seminíferos apresentaram lúmens fechados com epitélio germinativo contendo G_{Aund} e G_{Adif} envolvidas por células de Sertoli. O valor do IGS foi significativamente menor neste estágio ($H=38,9$; $p < 0,001$) (Tab 1). Durante a maturação, os túbulos exibiam cistos com G_B , C_1 , C_2 , T, podendo conter pequena quantidade de Z no lúmen tubular. No estágio maduro, os testículos apresentaram IGS mais elevado (0,26%) e túbulos seminíferos largos contendo células germinativas em todas as fases de desenvolvimento, com predominância de Z, seguido por C_1 ($H=253,2$; $p < 0,0001$). Testículos espermiados apresentaram túbulos seminíferos com lúmens abertos e epitélio germinativo contendo principalmente G_{Adif} e SC, enquanto G_B , C_1 , T e Z foram menos numerosas. Não houve diferença no valor de K entre os estádios reprodutivos (Tab 1).

Expressão de Ki67, IGF1, IGF2 e apoptose

A expressão de Ki67 ocorreu principalmente em G_{Aund} , G_{Adif} , G_B e SC. A proliferação de espermatogônias A ocorreu durante toda a espermatogênese, com predominância das G_{Aund} no estágio maduro ($H=56,9$; $p < 0,001$) (Fig 1a, Fig 2a-d). G_B marcadas por Ki67 foram predominantes no estágio de maturação ($U=107,5$; $p=0,01$) e C_1 marcados foram observados apenas neste estágio. C_2 mostrando marcação positiva para Ki67 foi raramente observado ($< 1\%$) e, portanto, não foi apresentada nos gráficos. SC expressando Ki67 foram significativamente mais numerosas no estágio de maturação ($H=9,8$; $p=0,007$) e não foram observadas no estágio maduro. SC Ki67

positivas foram frequentemente encontradas associadas às G_{Aund} e a cistos de G_{Adif} , G_B e C_1 . Interessantemente, na maioria dos cistos onde as células de Sertoli expressavam Ki67, células germinativas não apresentaram marcação.

Reações positivas para TUNEL foram observadas em G_{Aund} , G_B , C_1 , T, Z e SC. O estágio espermiado apresentou mais células TUNEL-positivas do que os outros estádios ($H=23,1$; $p < 0,001$). Um baixo número de C_1 e T marcadas para TUNEL foram observados nos testículos em maturação e maduros (Fig 1b, Fig 2e-h).

Imunomarcação para IGF1 foi observada em G_{Aund} , G_{Adif} , C_1 , T e SC nos diferentes estádios de maturação testicular (Fig 3a, c, e, g). A expressão de IGF1 em G_{Aund} e G_{Adif} ocorreu nos estádios repouso, maturação e espermiado sem diferença significativa entre eles (Fig 1c). C_1 apresentou maior expressão de IGF1 no estágio maduro, bem como a maioria das T (~81%) ($U=13,5$; $p < 0,001$). Não houve diferenças significativas nas SC positivas para IGF1, mas observou-se tendência de serem mais numerosas no repouso e maturação ($H=4,8$; $p=0,19$). C_2 e Z não foram marcados por IGF1.

A expressão de IGF2 ocorreu principalmente nos estádios maduro e espermiado. Alta proporção para G_{Aund} marcadas para IGF2 ocorreram no estágio maduro ($U=92,0$; $p < 0,001$) (Fig 1d, Fig 3b, d, f, h). T marcadas foram encontradas na maturação e em elevada proporção no estágio maduro ($U=126$; $P < 0,001$). SC marcadas para IGF2 foram encontradas em testículos espermiados sempre associadas a espermatogônias.

A expressão de Ki67 e IGF1 ocorreu em todos os estádios da maturação testicular. Considerando o número total de células marcadas, Ki67 apresentou predomínio no repouso e maturação ($H=95,1$; $p < 0,001$), considerável redução no maduro e retomada no aumento de células marcadas em testículos espermiados (Fig 1e). IGF1 foi muito expresso no repouso e maduro com considerável redução na maturação e espermiado ($H=37,0$; $p < 0,001$). Por outro lado, IGF2 foi mais expresso no maduro e espermiado ao passo que a reação de TUNEL foi detectada na maturação e principalmente no espermiado ($H=23,1$; $p < 0,001$).

A análise de componentes principais mostrou proximidade dos estádios repouso e maturação inicial, devido à alta correlação de vários tipos celulares expressando Ki67 e IGF1 nestes estádios, com exceção IGF1 em C_1 e, principalmente, Ki67 em G_{Aund} que mostrou alta associação ao estágio maduro (PC1 -0,27, PC2 0,17) (Fig 4). A associação da expressão de IGF2 em todos os tipos celulares identificados ocorreu aos estádios maduro e espermiado. Todos os tipos celulares que apresentaram reações TUNEL

positivas foram associados ao espermiado com G_{Aund} , G_B , Z e SC possuindo o mesmo grau de correlação a este estágio (PC1 0,27, PC2 0,18) (Fig 4). Os valores de correlação das variáveis nos dois componentes principais estão na Tab S1.

Discussão

O presente estudo foi o primeiro a avaliar em conjunto a proliferação, apoptose e expressão de IGF1 e IGF2 em testículos de um teleósteo em condições naturais. Além disso, este é o primeiro estudo a imunolocalizar os peptídeos IGF1 e IGF2 nas células testiculares de um peixe siluriforme. Nesse trabalho demonstramos que G_{Aund} , G_{Adif} , T e SC podem expressar IGF1 e IGF2 no mesmo estágio ou em diferentes estágios e que G_{Aund} e G_{Adif} proliferam durante todo o ciclo reprodutivo de *H. garmani*. Os dados obtidos contribuem para um melhor entendimento do papel do IGF1 e IGF2 na regulação da espermatogênese e durante a maturação testicular em peixes.

Neste trabalho, o anticorpo Ki67 foi utilizado a fim de se identificar a proliferação das células germinativas durante a espermatogênese. Nos testículos em repouso e em maturação ocorreu alta expressão de IGF1 e também de Ki67 nas G_{Aund} e G_{Adif} sugerindo que IGF1 tenha relação com a alta proliferação dessas células nestes estágios. Em acordo com essa hipótese, foi identificada síntese de DNA em cultura de espermatogônias e espermatócitos de *Oncorhynchus mykiss* tratadas com IGF1 e IGF2 (Loir and Le Gac 1994) e a expressão do receptor de IGF1 em espermatogônias tipo A de *Sparus aurata* (Perrot et al. 2000). Além disso, um estudo em cultura de células germinativas de camundongos demonstrou que a ativação do receptor de IGF1 (IGF1R) pelo peptídeo IGF1 promove proliferação espermatogonial e diferenciação de espermatogônias em espermatócitos primários (Shen et al. 2014). No estágio maduro, ocorreu expressão de IGF2 nas G_{Aund} e G_{Adif} simultaneamente com alta expressão de Ki67, o que pode indicar ação do IGF2 no início da renovação de espermatogônias para o próximo ciclo. Em contrapartida, as G_{Aund} e G_{Adif} apresentaram expressão de IGF1 e IGF2 e mantiveram-se em proliferação no estágio espermiado. Assim, é possível que IGF1 e IGF2 atuem na proliferação espermatogonial simultaneamente ou não, de acordo com o estágio de maturação testicular.

Com exceção do estágio maduro, todos os demais apresentaram expressão de IGF1 e proliferação de SC, e no espermiado ocorreu expressão de ambos, IGF1 e IGF2. Um estudo recente revelou que os IGFs são um dos mais importantes fatores de crescimento que regulam o número de SC (Pitetti et al. 2013). A utilização de

camundongos knockout para IGF1R em SC, resultou na diminuição da proliferação das SC e consequente redução testicular durante o desenvolvimento neonatal. A imunolocalização de IGF1 em testículos maduros também foi relatada em *Astyanax fasciatus* (Prado et al. 2018). No presente estudo, o fato de se observar expressão de IGF1 em SC de testículos maduros e a ausência de proliferação de SC pode indicar ação parácrina deste fator sobre as células germinativas nesse estágio.

A apoptose é um componente integral do processo espermatogênico atuando no controle do número de células germinativas que as SC podem suportar e eliminando células germinativas que sofreram algum erro incompatível com seu desenvolvimento (Yin et al. 1998). Em peixes de reprodução sazonal, as células apoptóticas mais comuns são espermatogônias e espermatócitos de testículos em maturação, e também, durante o período de recrudescência testicular (Corriero et al. 2007). Nossos dados mostram que durante a maturação apenas C₁ e T apresentam reações TUNEL-positivas e em baixas proporções quando comparado ao estágio espermiado. No estágio espermiado, as reações positivas ocorreram principalmente naquelas células que não estarão presentes no epitélio seminífero em repouso como G_B, C₁ e T. Nos testículos espermiados, foram também observadas reações TUNEL-positivas em Z, o que indica ocorrência de apoptose nessa fase. Estudos em humanos indicam que o estresse oxidativo durante a espermiogênese pode ser responsável pela apoptose em espermatozoides (Aitken and Koppers 2011). Sabe-se que a SC possui a capacidade de fagocitar células remanescentes no lúmen tubular durante a regressão testicular, como demonstrado em *Leporinus taeniatus* (Ribeiro et al. 2017). No entanto, assim como observado em *Prochilodus argenteus* (Domingos et al. 2013), bem como no peixe-espada *Xiphias gladius*, a presença de células TUNEL-positivas dentro do lúmen tubular permite formular a hipótese de que tais células germinativas em degeneração podem ser eliminadas via abertura genital (Corriero et al. 2007).

O envolvimento de IGFs na regulação do desenvolvimento, diferenciação das células germinativas e reprodução está diretamente ligado a sua função de promover mitose e inibir apoptose (Duan, 1997; Manfred Reinecke, 2010b). De fato, quando poucos C₁ e T expressavam IGF1 e IGF2, estádios maturação e espermiado, essas células apresentaram maior proporção de reações TUNEL positivas, o que sugere ação antiapoptótica de ambos os fatores de crescimento. Nossos resultados são suportados por trabalhos anteriores onde foi demonstrado que IGF1 regula o ciclo celular e inibe apoptose em diferentes tipos celulares (Shelton et al. 2004; Maldonado et al. 2005).

Outro estudo demonstrou ainda que a suplementação com IGF1 em cultura de testículo de camundongo aumentou a porcentagem de espermátides alongadas por reduzir a apoptose (Yao et al. 2017). Nossos dados sugerem que o aumento da expressão de IGF1 e IGF2 diminui a proporção de células apoptóticas dependendo do estágio de maturação testicular de *H. garmani*.

As informações sobre o papel do IGF2 na espermatogênese de teleósteos ainda são limitadas. De forma geral, em *H. garmani* a expressão de IGF2 foi maior nos estádios maduro e espermiado. Sua função parece estar relacionada a proliferação espermatogonial, especialmente em testículos maduros, e diferenciação de espermátides em espermatozoides. Em contrapartida, um estudo conduzido com truta mostrou expressão de *igf2* mRNA em G_A, G_B, C₁, C₂, T e SC em testículos de peixes adultos, mas os níveis de expressão foram maiores em testículos imaturos (Perrot and Funkenstein 1999). Um estudo recente demonstrou que testículos de homens com hipoespermatogênese possuíam elevados níveis miR-210 microRNA e baixos níveis de IGF2. O tratamento de células tronco espermatogênica com miR-210 microRNA diminuiu a expressão de *igf2* mRNA e sua atividade proliferativa, indicando papel de IGF2 na produção espermática (Tang et al. 2016). Sabe-se também que IGF2 tem papel fundamental no desenvolvimento embrionário e fetal e sua importância se torna menos significativa no período pós-natal, onde sua função pode ser substituída em parte por IGF1 (Griffeth et al. 2014). Em nosso trabalho, observamos que em G_{Aund}, G_{Adif} e SC associadas a essas células em testículos espermiados expressaram IGF1 e IGF2. Devido a clara relação de proliferação espermatogonial com IGF2 nos testículos maduros, é possível haver ação conjunta de IGF1 e IGF2 durante a regressão testicular. Um estudo estágio específico usando knockout para IGF2 em células germinativas pode ajudar entender a função isolada de IGF1 e IGF2 nesse estágio reprodutivo.

No que diz respeito a proliferação e morte das SC, nós observamos que a proliferação deste tipo celular ocorreu quando estavam associadas a espermatogônias para formação de novos cistos e a cistos de C₁ em desenvolvimento. Este padrão é conhecido como modo 1 e modo 2, respectivamente, e foi primeiramente observado em *O. niloticus* e *Clarias gariepinus* (Schulz et al. 2005). Curiosamente quando as SC estavam em proliferação as células germinativas não estavam. Isto sugere que existe uma sincronização para a proliferação dessas células, onde é plausível pensar que as SC proliferam primeiro para aumentar a capacidade de suporte às células germinativas e posteriormente estas podem aumentar em número e se diferenciar. Por outro lado, a

apoptose das células de SC ocorreu apenas no estágio espermiado. As informações sobre apoptose fisiológica de SC em anamniotas são escassas, mas claras evidências são encontradas em tubarões, onde as SC entram em apoptose após o rompimento dos cistos na espermição (McClusky 2013; de Franca et al. 2015). Em nosso trabalho observamos que a maioria das SC TUNEL-positivas não estavam associadas a células germinativas o que sugere que possam ser células remanescentes de cistos pós-espermição.

Em conclusão, os resultados deste trabalho indicam que as células espermatogênicas expressam diferencialmente ambos, IGF1 e IGF2, ao longo de um ciclo reprodutivo com predominância de IGF1 nos estádios repouso, maturação e maduro e sobreposição de IGF1 e IGF2 no espermiado. Nós propomos que a proliferação das células germinativas nas fases iniciais do ciclo reprodutivo seja influenciada pela ação de IGF1, no maduro por IGF2 e que a proliferação durante a regressão testicular seja influenciada pela ação combinada de IGF1 e IGF2. Nós também propomos que a diminuição da expressão de ambos os IGFs pode contribuir para o aumento da apoptose das células germinativas nos testículos de teleósteos.

Tabela 1: Diâmetro nuclear, proporção (%) de células germinativas, diâmetro do túbulo seminífero (TS), índice gonadossomático (IGS) e fator de condição de Fulton (K) por estágio de maturação testicular de *Hypostomus garmani* do alto Rio das Velhas, Brasil.

| | Diâmetro nuclear (µm) | Repouso | Maturação | Maduro | Espermiado |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| G_{Aund} | 9,39 ± 0,08 | 21,6 ± 2,26 ^b | 4,1 ± 0,65 ^c | 2,4 ± 0,32 ^{cd} | 9,80 ± 1,38 ^c |
| G_{Adif} | 7,15 ± 0,05 | 55,9 ± 2,26 ^a | 23,4 ± 1,52 ^a | 1,3 ± 0,17 ^d | 49,86 ± 2,37 ^a |
| G_B | 6,13 ± 0,06 | ausente | 14,0 ± 1,50 ^b | 2,0 ± 0,77 ^d | 2,54 ± 0,70 ^d |
| C₁ | 4,66 ± 0,01 | ausente | 36,3 ± 2,0 ^a | 25,0 ± 1,75 ^a | 6,30 ± 1,53 ^c |
| C₂ | 3,61 ± 0,03 | ausente | 4,3 ± 0,86 ^c | 5,6 ± 0,68 | ausente |
| T | 2,72 ± 0,02 | ausente | 5,8 ± 1,05 ^c | 13,7 ± 1,49 ^b | 1,80 ± 0,62 ^d |
| Z | 2,14 ± 0,01 | ausente | 3,3 ± 1,42 ^c | 46,1 ± 1,95 ^a | 9,10 ± 1,63 ^c |
| Sertoli | nd | 22,5 ± 1,0 ^b | 8,8 ± 0,98 ^b | 3,9 ± 0,36 ^{bc} | 20,6 ± 1,42 ^b |
| TS | - | 50,3 ± 2,1 ^c | 158,7 ± 7,9 ^b | 230,6 ± 4,9 ^a | 129,1 ± 1,7 ^b |
| IGS | - | 0,04 ± 0,01 ^c | 0,08 ± 0,02 ^b | 0,26 ± 0,04 ^a | 0,12 ± 0,02 ^b |
| K | - | 1,10 ± 0,01 ^a | 1,15 ± 0,03 ^a | 1,07 ± 0,03 ^a | 1,06 ± 0,02 ^a |

Valores representam média ± erro padrão, (G_{Aund}) espermatogônias tipo A indiferenciadas, (G_{Adif}) espermatogônias tipo A diferenciadas, (G_B) espermatogônias tipo B, (C₁) espermatócitos primários, (C₂) espermatócitos secundários, (T) espermatídes, (Z) espermatozóides e células de Sertoli (Sertoli). Não definido (nd). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tipos celulares, exceto TS, IGS e K onde as letras representam diferenças entre os estádios. Kruskal-Wallis, p < 0,05.

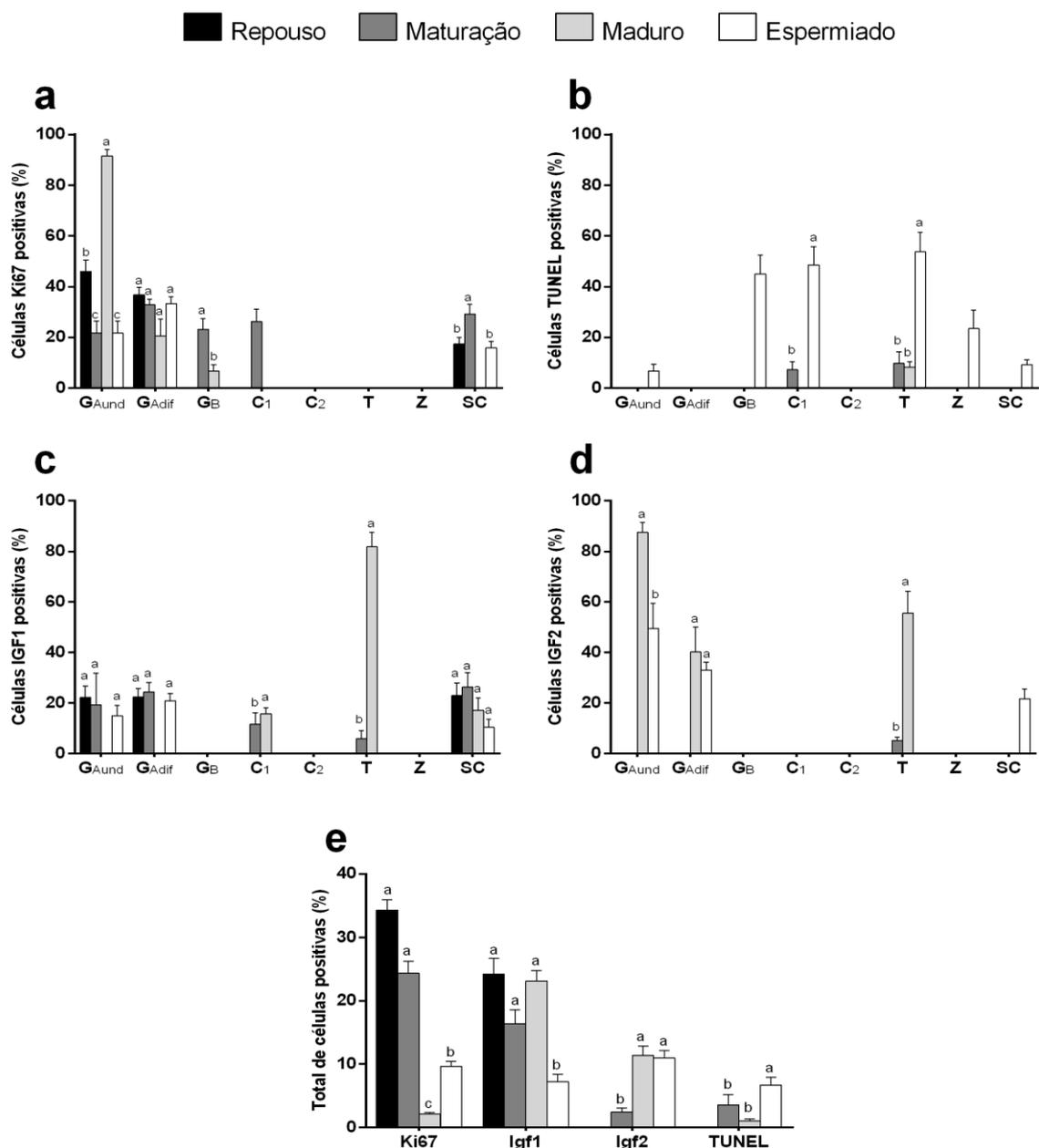


Figura 1 – Proporção de células germinativas e células de Sertoli dos machos de *Hypostomus garmani* do alto rio das Velhas que expressam Ki67 (a) IGF1 (b) IGF2 (c), células TUNEL-positivas (d) e percentual total de expressão das 3 proteínas e reação TUNEL-positiva (e) em diferentes estágios de maturação testicular. Espermatogônia A indiferenciada (G_{Aund}), diferenciada (G_{Adif}) e tipo B (G_B), espermatócito primário (C₁), espermatócito secundário (C₂) espermatíde (T), espermatozoide (Z) e célula de sertoli (SC). Letras diferentes indicam diferenças entre os estágios de maturação gonadal. Man-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis para três ou quatro grupos; P<0,05.

Figura 2 - Reação imunohistoquímica para Ki67 (a-d) e TUNEL (e-h) em túbulos seminíferos de *Hypostomus garmani*. **a** Túbulos seminíferos em repouso mostrando células de Sertoli marcadas (seta) ou não (cabeça de seta) e espermatogônias A diferenciada (G_{Adif}). Note que quando a célula germinativa apresenta marcação, células de Sertoli ao redor não expressam Ki67. **b** Túbulo seminífero em maturação inicial contendo cistos de G_{Aund} , G_{Adif} , espermatogônias tipo B (G_B), espermatócito primário (C_1) e espermatídes (T) e apenas célula de sertoli em proliferação. **c** Túbulos seminíferos com lúmen repleto de espermatozoides (Z) com apenas algumas G_{Aund} e G_{Adif} expressando Ki67. **d** Túbulo seminífero vazio apresentando proliferação de célula de Sertoli e G_{Aund} . **e** Túbulo em maturação mostrando reação TUNEL-positiva em C_1 e T. Túbulos espermiados mostrando marcação em G_{Aund} (**f**), célula de Sertoli (**g**), (G_B), C_1 , T e Z (**h**).

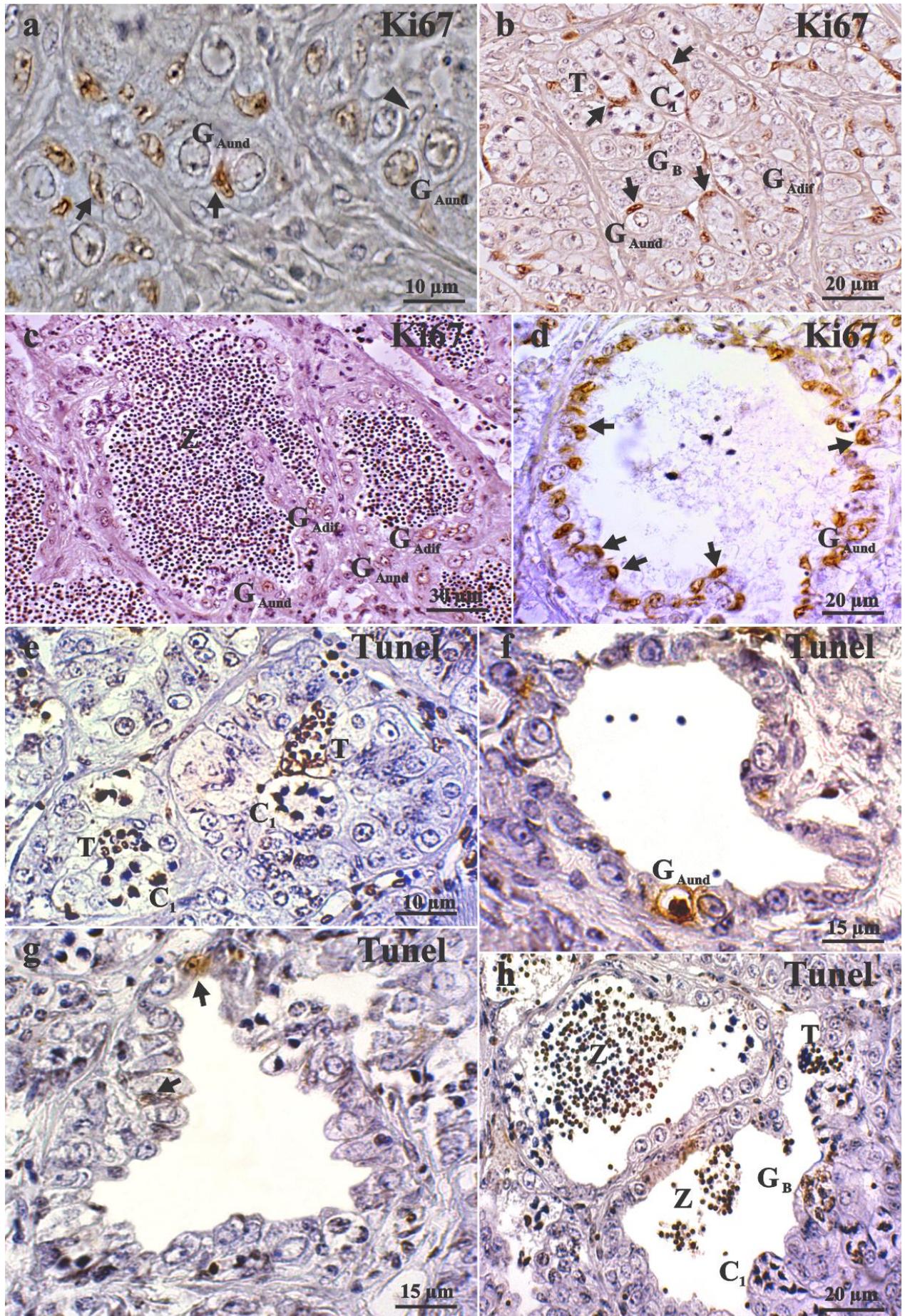
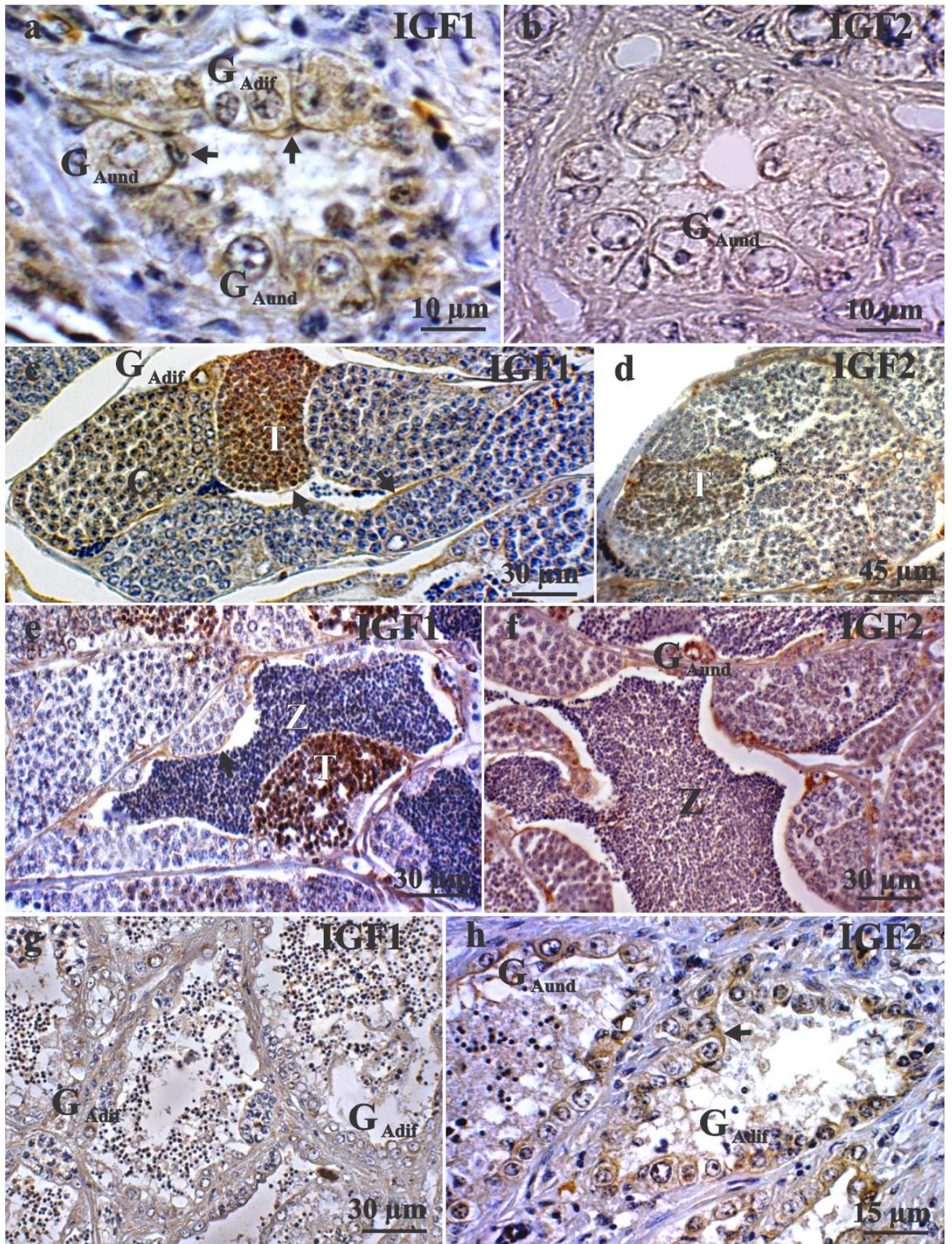


Figura 3 - Reação imunohistoquímica para IGF1 (a,c,e,g) e IGF2 (b,d,f,h) em túbulos seminíferos de *Hypostomus garmani*. Nos túbulos seminíferos em repouso IGF1 foi expresso em células de Sertoli (seta) espermatogônias tipo A indiferenciadas (G_{Aund}) e diferenciadas (G_{Adif}) (a). Túbulos em repouso não apresentaram expressão de IGF2 (b). c Túbulos em maturação inicial contendo pequena quantidade de espermatozoides (Z) no lúmen mostrando forte marcação de IGF1 principalmente em espermátides (T) e espermatócitos primários (C_1). Note G_{Adif} também marcadas. d Espermátides apresentando reações positivas para IGF2 em um túbulo em maturação inicial. e Túbulo maduro mostrando, T e prolongamentos de células de Sertoli (seta) expressando IGF1. f Túbulo maduro mostrando expressão de IGF2 em G_{Aund} . Túbulo espermiado contendo Z e C_1 residuais mostrando expressão de IGF1 em poucas espermatogônias (g), mas IGF2 foi amplamente expresso em espermatogônias G_{Aund} , G_{Adif} e células de Sertoli (h).



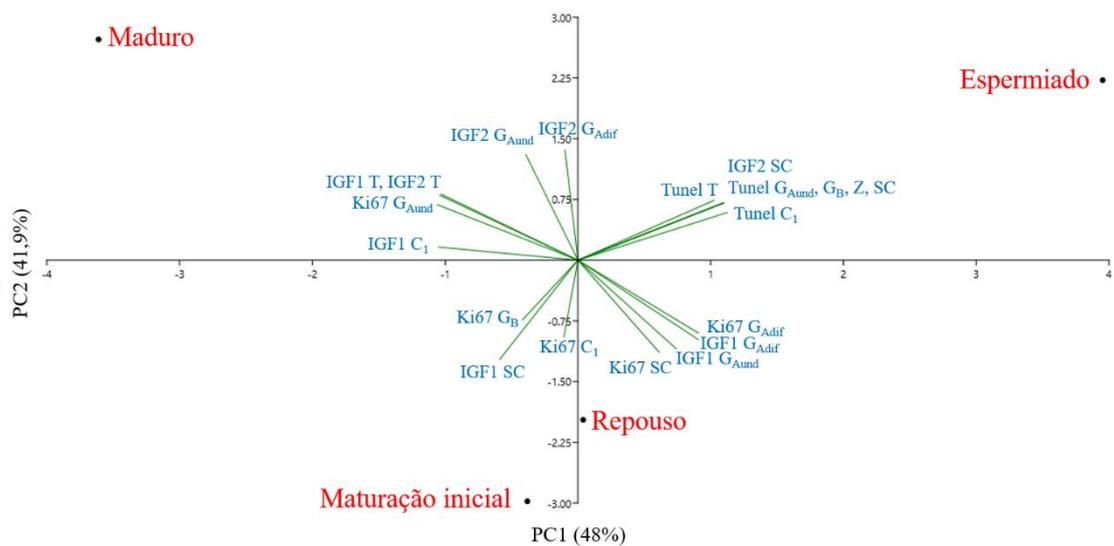


Figura 4 – Biplot da análise de componentes principais (PCA) mostrando a associação entre marcação de Ki67, IGF1, IGF2 e TUNEL por tipo celular e estágio de maturação testicular de *Hypostomus garmani*. Espermatogônia tipo A indiferenciada (G_{Aund}), diferenciada (G_{Adif}) e tipo B (G_B), espermatócito primário (C1), espermatíde (T), espermatozoide (Z) e célula de Sertoli (SC).

Conclusão

- A atividade reprodutiva de *H. gamani* no alto Rio das Velhas ocorre ao longo do ano com desova parcelada concentrada de dezembro a março.
- Características morfológicas dos folículos ovarianos indicam que *H. garmani* desova em ambientes onde os ovos estão sujeitos a abrasão, possuem cuidado parental e, portanto, se aproxima da estratégia de equilíbrio.
- A expressão de IGF1 e IGF2 varia ao longo da maturação testicular de *H. garmani*.
- A proliferação das espermatogônias ocorre durante toda a maturação testicular de *H. garmani* concomitante a elevada expressão de IGF1 no repouso e maturação, IGF2 no maduro e de ambos no espermiado.
- A diminuição da expressão de ambos os IGFs pode contribuir para o aumento da apoptose das células germinativas e remodelação tecidual em testículos espermiados de *H. garmani*.

Referências

- Albert JS, Petry P, Reis RE. 2011. Major biogeographic and phylogenetic patterns. In: Albert JS, Reis RE, editors. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Los Angeles: University of California Press. pp. 21–57.
- Agostinho AA, Barbieri G, Verani JR, Hah NS (1990) Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis áspera* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) no Rio Paranapanema, Porecatu. *Cienc. Cult.* 42:711–714
- Aitken RJ, Koppers AJ (2011) Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 13:36–42. doi: 10.1038/aja.2010.68
- Baker J, Hardy MP, Zhou J, et al (1996) Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10:903–18. doi: 10.1210/mend.10.7.8813730
- Berishvili G, D’Cotta H, Baroiller JF, et al (2006) Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol* 146:204–210
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, et al (2013) Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18:. doi: 10.4317/medoral.18573
- Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, et al (2013) Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 14:. doi: 10.1186/1471-2121-14-32
- Caelers A, Berishvili G, Meli ML, et al (2004) Establishment of a real-time RT-PCR for the determination of absolute amounts of IGF-I and IGF-II gene expression in liver and extrahepatic sites of the tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 137:196–204
- Campbell B, Dickey J, Beckman B, et al (2006) 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. *Biol Reprod* 75:34–44. doi: 10.1095/biolreprod.105.049494
- Campbell B, Dickey JT, Swanson P (2003) Endocrine Changes During Onset of Puberty in Male Spring Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*1. *Biol Reprod* 69:2109–2117. doi: 10.1095/biolreprod.103.020560
- Casatti L, Castro RMC (1998) A fish community of the São Francisco River headwaters riffles, southeastern Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 9:229–242
- Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J, García Ayala A (2005) An Overview of Cell Renewal in the Testis Throughout the Reproductive Cycle of a Seasonal Breeding Teleost, the Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L)1. *Biol Reprod* 72:593–601. doi: 10.1095/biolreprod.104.036103
- Constância M, Hemberger M, Hughes J, et al (2002) Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 417:945–948. doi:

10.1038/nature00819

Cook-Hildreth L, Bonner T, Huffman D (2016) Female reproductive biology of an exotic suckermouth armored catfish (Loricariidae) in the San Marcos River, Hays Co., Texas, with observations on environmental triggers. *BioInvasions Rec* 5:173–183. doi: 10.3391/bir.2016.5.3.09

Corriero A, Desantis S, Bridges CR, et al (2007) Germ cell proliferation and apoptosis during different phases of swordfish (*Xiphias gladius* L.) spermatogenetic cycle. *J Fish Biol* 70:83–99. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01257.x

Coward K, Bromage NR, Hibbitt O, Parrington J (2002) Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fish* 12:33–58. doi: 10.1023/A:1022613404123

Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, et al (2016) Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* 535:308–312. doi: 10.1038/nature18610

de Franca LR, Nóbrega RH, Morais R, et al (2015) Sertoli cell structure and function in anamniote vertebrates. *Sertoli Cell Biol* 385–407. doi: 10.1016/B978-0-12-417047-6.00013-2

De Rooij DG, Russell LD (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 6512:776–798. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03408.x

Domingos FFT, Thomé RG, Martinelli PM, et al (2013) Role of HSP70 in the regulation of the testicular apoptosis in a seasonal breeding teleost *Prochilodus argenteus* from the São Francisco river, Brazil. *Microsc Res Tech* 76:350–356. doi: 10.1002/jemt.22173

Drummond CD, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y (2000) Postovulatory Follicle: A Model for Experimental Studies of Programmed Cell Death or Apoptosis in Teleosts. *Zoology* 176–182

Duan C (1997) The Insulin-like Growth Factor System and Its Biological Actions in Fish. *Amer Zool* 37:491–503

Duarte S, Araújo FG, Bazzoli N (2011) Reproductive plasticity of *Hypostomus affinis* (Siluriformes: Loricariidae) as a mechanism to adapt to a reservoir with poor habitat complexity. *Zool* 28:577–586. doi: 10.1590/S1984-46702011000500005

Fausto AM, Picchietti S, Taddei AR, et al (2004) Formation of the egg envelope of a teleost, *Dicentrarchus labrax* (L.): Immunochemical and cytochemical detection of multiple components. *Anat Embryol (Berl)* 208:43–53. doi: 10.1007/s00429-003-0372-z

Froese R (2006) Cube law, condition factor and weight-length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *J Appl Ichthyol* 22:241–253. doi: 10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, et al (2007) Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14:1237–1243. doi: 10.1038/sj.cdd.4402148

- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19:107–120. doi: 10.1038/cdd.2011.96
- Garavello JC, Garavello JP (2004) Spatial distribution and interaction of four species of the catfish genus *Hypostomus* Lacépède with bottom of Rio São Francisco, Canindé do São Francisco, Sergipe, Brazil (Pisces, Loricariidae, Hypostominae). *Braz J Biol* 64:591–598. doi: 10.1590/S1519-69842004000400006
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J Cell Biol* 119:493–501. doi: 10.1083/jcb.119.3.493
- Godinho HP (2007) Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev Bras Reprodução Animal* 31:351–360
- Gomes ID, Araújo FG, Uehara W, Sales A (2011) Reproductive biology of the armoured catfish *Loricariichthys castaneus* (Castelnau, 1855) in Lajes reservoir, southeastern Brazil. *J Appl Ichthyol* 27:1322–1331. doi: 10.1111/j.1439-0426.2011.01874.x
- Gomez JM, Weil C, Ollitrault M, et al (1999) Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 113:413–428. doi: 10.1006/gcen.1998.7222
- Grier H (2000) Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J Morphol* 243:265–281. doi: 10.1002/(SICI)1097-4687(200003)243:3<265::AID-JMOR4>3.0.CO;2-I
- Grier HJ (1981) Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am Zool* 21:345–357
- Grier HJ, Taylor RG (1998) Testicular maturation and regression in the common snook. *J Fish Biol* 53:521–542. doi: 10.1006/jfbi.1998.0718
- Griffeth RJ, Bianda V, Nef S (2014) The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic Clinical Androl* 24:1–10
- Gurgel HDCB (2004) Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. *Rev Bras Zool* 21:131–135. doi: 10.1590/S0101-81752004000100022
- Higuchi K, Gen K, Izumida D, et al (2016) Changes in gene expression and cellular localization of insulin-like growth factors 1 and 2 in the ovaries during ovary development of the yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Gen Comp Endocrinol* 232:86–95. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.01.002
- Huettenbrenner S, Maier S, Leisser C, et al (2003) The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 543:235–249. doi: 10.1016/S1383-5742(02)00110-2

- Huhtaniemi IT, Themmen APN (2005) Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine* 26:207–217. doi: 10.1385/ENDO:26:3:207
- Kagawa H, Moriyama S, Kawauchi H (1995) Immunocytochemical localization of IGF-I in the ovary of the red seabream, *Pagrus major*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99:307–315
- Kah O, Anglade I, Leprêtre E, et al (1993) The reproductive brain in fish. *Fish Physiol Biochem* 11:85–98. doi: 10.1007/BF00004554
- Kelman Z (1997) PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14:629–640. doi: 10.1038/sj.onc.1200886
- Lacerda SM dos SN, Costa GMJ, de França LR (2014) Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *Gen Comp Endocrinol* 207:56–65. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.06.018
- Le Gac F, Loir M, Le Bail PY, Ollitrault M (1996) Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and sertoli cells. *Mol Reprod Dev* 44:23–35. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199605)44:1<23::AID-MRD3>3.0.CO;2-V
- Lima-Junior R. SE& G (2006) FATOR DE CONDIÇÃO E CICLO GONADAL DE FÊMEAS DE *Pimelodus maculatus* (OSTEICHTHYES, PIMELODIDAE) NO RIO PIRACICABA (SP, BRASIL). *Bol do Inst Pesca* 32:87–94. doi: 10.4025/actascibiolsoci.v28i2.1028
- Loir M, Le Gac F (1994) Insulin-like growth factor-I and -II binding and action on DNA synthesis in rainbow trout spermatogonia and spermatocytes. *Biol Reprod* 51:1154–1163. doi: 10.1095/biolreprod51.6.1154
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J (2010) Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 165:367–389. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.05.022
- Macedo R, Bueno X, Oliveira MR, Chellappa S (2017) Desenvolvimento gonadal , fecundidade e tipo de desova do cascudo , *Hypostomus puarum* (Starks , 1913) (Actinopterygii : Loricariidae) do açude Marechal Dutra , Rio Grande do Norte , Brasil. 30–33
- Maldonado C, Cea P, Adasme T, et al (2005) IGF-1 protects cardiac myocytes from hyperosmotic stress-induced apoptosis via CREB. *Biochem Biophys Res Commun* 336:1112–1118. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.245
- Martins YS, de Moura DF, Santos GB, et al (2010) Comparative folliculogenesis and spermatogenesis of four teleost fish from a Reservoir in south-eastern Brazil. *Acta Zool* 91:466–473. doi: 10.1111/j.1463-6395.2009.00437.x
- McClusky LM (2013) The caspase-dependent apoptosis gradient in the testis of the blue shark, *Prionace glauca*. *Reproduction* 145:297–310. doi: 10.1530/REP-12-0216
- Melo RMC, Arantes FP, Sato Y, et al (2011) Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). *J Morphol* 272:525–535. doi: 10.1002/jmor.10931
- Melo RMC, Gomes DD, Moreira DP, et al (2017) Comparative morphology of the

reproductive system of seven species of ostariophysan fishes from the upper Das Velhas River, Brazil. *J Morphol* 278:170–181. doi: 10.1002/jmor.20627

Mengmeng H, Lijun W, Yinghui C, et al (2016) Effect of Wuziyanzong pill on levels of sex hormones, and expressions of nuclear- associated antigen Ki-67 and androgen receptor in testes of young rats. *J Tradit Chinese Med* 36:743–748. doi: 10.1016/S0254-6272(17)30009-2

Mereles M de A, Sant'Anna IRA, Sousa RGC (2017) Length-weight relationship of fishes species from the tributaries of Machado River , located in pasture lands (Rondônia State - Brazil). *Acta Fish Aquat Resour* 5:43–51. doi: 10.2312/ActaFish.2017.5.1.43-51

Miura T, Miura C (2001) Japanese Eel: A Model for Analysis of Spermatogenesis. *Zoolog Sci* 18:1055–1063. doi: 10.2108/zsj.18.1055

Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1991) Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci* 88:5774–5778. doi: 10.1073/pnas.88.13.5774

Morais RDVS, Crespo D, Nóbrega RH, et al (2017) Antagonistic regulation of spermatogonial differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) by Igf3 and Amh. *Mol Cell Endocrinol* 454:112–124. doi: 10.1016/j.mce.2017.06.017

Morita Y, Manganaro TF, Tao XJ, et al (1999) Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology* 140:941–949. doi: 10.1210/endo.140.2.6539

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, et al (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858. doi: 10.1038/35002501

Nagahama Y, Yamashita M (2008) Regulation of Oocyte Maturation in Fish. *Dev Growth Differ* 50:195–219. doi: 10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x

Nakayama Y, Yamamoto T, Abé SI (1999) IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. *Int J Dev Biol* 43:343–347

Nóbrega RH, Batlouni SR, França LR (2009) An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem* 35:197–206. doi: 10.1007/s10695-008-9252-z

Nóbrega RH, De Souza Morais RDV, Crespo D, et al (2015) Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3. *Endocrinology* 156:3804–3817. doi: 10.1210/en.2015-1157

Ohta T, Miyake H, Miura C, et al (2007) Follicle-Stimulating Hormone Induces Spermatogenesis Mediated by Androgen Production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *Biol Reprod* 77:970–977. doi: 10.1095/biolreprod.107.062299

Parenti LR, Grier HJ (2004) Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr Comp Biol* 44:333–348. doi: 10.1093/icb/44.5.333

Patino R, Sullivan C V (2002) Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in

teleost fish. *Fish Physiol Biochem* 26:57–70. doi: 10.1023/A:1023311613987

Perrot V, Funkenstein B (1999) Cellular distribution of insulin-like growth factor II (IGF-II) mRNA and hormonal regulation of IGF-I and IGF-II mRNA expression in rainbow trout testis (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* 20:219–229

Perrot V, Moiseeva EB, Gozes Y, et al (2000) Insulin-like growth factor receptors and their ligands in gonads of a hermaphroditic species, the gilthead seabream (*Sparus aurata*): expression and cellular localization. *Biol Reprod* 63:229–41

Pessoa EKR, Lima LTB de, Chellappa NT, et al (2013) Aspectos alimentares e reprodutivos do cascudo, *Hypostomus puarum* (Starks, 1913) (Osteichthyes: Loricariidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. *Biota Amaz* 3:45–53. doi: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v3n3p45-53

Picha ME, Shi B, Thomas P (2012) Dual role of IGF-II in oocyte maturation in southern flounder *Paralichthys lethostigma*: Up-regulation of mPR α and resumption of meiosis. *Gen Comp Endocrinol* 177:220–230. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.04.017

Pitetti J-L, Calvel P, Zimmermann C, et al (2013) An Essential Role for Insulin and IGF1 Receptors in Regulating Sertoli Cell Proliferation, Testis Size, and FSH Action in Mice. *Mol Endocrinol* 27:814–827. doi: 10.1210/me.2012-1258

Pompeu PS, Alves CBM (2005) The Effects of Urbanization on Biodiversity and Water Quality in the Rio das Velhas Basin, Brazil. *Am Fish Soc Symp* 47:11–22

Porter AG, Jänicke RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6:99–104. doi: 10.1038/sj.cdd.4400476

Power ME (1984) The importance of sediment in the grazing ecology and size class interactions of an armored catfish, *Ancistrus spinosus*. *Environ Biol Fishes* 10:173–181. doi: 10.1007/BF00001124

Prado PS, Paula A, Pinheiro B, et al (2018) Expression patterns and immunolocalisation of IGF-I and IGF-II in male and female gonads of the Neotropical characid fish *Astyanax fasciatus*. *Fish Physiol Biochem*. doi: <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0550-9>

Prado PS, Souza CC, Bazzoli N, Rizzo E (2011) Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:1879–1887. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.07.017

Reindl KM, Sheridan MA (2012) Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 163:231–245. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.08.003

Reinecke M (2010a) Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone-insulin-like growth factor-I system. *J Fish Biol* 76:1233–1254. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02605.x

Reinecke M (2010b) Insulin-like Growth Factors and Fish Reproduction. *Biol Reprod* 82:656–661. doi: 10.1095/biolreprod.109.080093

Ribeiro YM, Matos SA de, Domingos FFT, et al (2017) Germ cell proliferation and

- apoptosis during testicular regression in a seasonal breeding fish kept in captivity. *Tissue Cell* 49:664–671. doi: 10.1016/j.tice.2017.09.003
- Riehl R, Patzner RA (1998) Minireview: The modes of egg attachment in teleost fishes. *Ital J Zool* 65:415–420. doi: 10.1080/11250009809386857
- Sales CF, Domingos FFT, Brighenti LS, et al (2016) Biological variables of *Hypostomus francisci* (Siluriformes: Loricariidae) from Itapecerica river, Minas Gerais state, Brazil. *An Acad Bras Cienc* 88:1603–1614. doi: 10.1590/0001-3765201620150513
- Santos HB, Rizzo E, Bazzoli N, et al (2005) Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *J Fish Biol* 67:1446–1459. doi: 10.1111/j.1095-8649.2005.00854.x
- Santos HB, Thomé RG, Arantes FP, et al (2008) Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology* 70:1449–1460. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.091
- Sawatari E, Shikina S, Takeuchi T, Yoshizaki G (2007) A novel transforming growth factor- β superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Biol* 301:266–275. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.10.001
- Scholzen T GJ (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9
- Schulz RW, de França LR, Lareyre JJ, et al (2010) Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165:390–411
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, et al (2005) Sertoli Cell Proliferation in the Adult Testis—Evidence from Two Fish Species Belonging to Different Orders. *Biol Reprod* 73:891–898. doi: 10.1095/biolreprod.105.039891
- Shelton JG, Steelman LS, White ER, McCubrey JA (2004) Synergy between PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK pathways in IGF-1R mediated cell cycle progression and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Cell Cycle* 3:372–379. doi: 10.4161/cc.3.3.747
- Shen G, Wu R, Liu B, et al (2014) Upstream and downstream mechanisms for the promoting effects of IGF-1 on differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes. *Life Sci* 101:49–55. doi: 10.1016/j.lfs.2014.02.016
- Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M (1998) The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: An immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 4:227–233. doi: 10.1093/molehr/4.3.227
- Stehr CM, Hawkes JW (1979) The comparative ultrastructure of the egg membrane and associated pore structures in the starry flounder, *Platichthys stellatus* (Pallas), and pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum). *Cell Tissue Res* 202:347–356. doi:

10.1007/BF00220430

Suzuki HI, Agostinho AA, Winemiller KO (2000) Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loricariid catfishes of the Parana River, Brazil. *J Fish Biol* 57:791–807. doi: 10.1006/jfbi.2000.1352

Tang D, Huang Y, Liu W, Zhang X (2016) Up-Regulation of microRNA-210 is Associated with Spermatogenesis by Targeting IGF2 in Male Infertility. *Med Sci Monit* 22:2905–2910. doi: 10.12659/MSM.897340

Tse MCL, Vong QP, Cheng CHK, Chan KM (2002) PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor-II. *Biochim Biophys Acta* 1575:63–74

Veloso-Júnior VC, Guimarães-Cruz RJ, Barros MDM, et al (2009) Reproduction of the lambari *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces: Characidae) in a small stream in Southeastern Brazil. *J Appl Ichthyol* 25:314–320. doi: 10.1111/j.1439-0426.2008.01152.x

Viana D, Wollf LL, Zaleski T, et al (2008) Population structure and somatic indexes of *Hypostomus cf. ancistroides* (Siluriformes, Loricariidae) collected from the Bonito River, Ivaí River Basin, Turvo, Paraná. *Brazilian Arch Biol Technol* 51:493–502. doi: 10.1590/S1516-89132008000300008

Viñas J, Piferrer F (2008) Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads. *Biol Reprod* 79:738–47

Wang DS, Jiao B, Hu C, et al (2008) Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochem Biophys Res Commun* 367:336–341. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.136

Weber AA, Moreira DP, Melo RMC, et al (2017) Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Sci Total Environ* 592:693–703. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.181

Wildner DD, Grier H, Quagio-Grassiotto I (2013) Female germ cell renewal during the annual reproductive cycle in Ostariophysians fish. *Theriogenology* 79:709–724. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.028

Wildt DE, Wemmer C (1999) Sex and wildlife: The role of reproductive science in conservation. *Biodivers Conserv* 8:965–976. doi: 10.1023/A:1008813532763

Winemiller KO (1989) Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia* 225–241. doi: 10.1007/BF00379810

Winemiller KO, Rose KA (1992) Patterns of Life-History Diversification in North American Fishes: implications for Population Regulation. *Can J Fish Aquat Sci* 49:2196–2218. doi: 10.1139/f92-242

Wood AW, Duan C, Bern HA (2005) Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int Rev Cytol* 243:215–285. doi: 10.1016/S0074-7696(05)43004-1

Yao J, Zuo H, Gao J, et al (2017) The effects of IGF-1 on mouse spermatogenesis using

an organ culture method. *Biochem Biophys Res Commun* 491:840–847. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.125

Yin Y, Stahl BC, DeWolf WC, Morgentaler A (1998) P53-Mediated Germ Cell Quality Control in Spermatogenesis. *Dev Biol* 204:165–171. doi: 10.1006/dbio.1998.9074

Zawadzki CH, Weber C, Pavanelli CS (2010) A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. *Neotrop Ichthyol* 8:719–725. doi: 10.1590/S1679-62252010000400003