



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE ESTUDOS EM SAÚDE E BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



JHENNIFER GOMES CORDEIRO

BIOLOGIA REPRODUTIVA DO LAMBARI *Astyanax bimaculatus*
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE).

Marabá, PA
2018

JHENNIFER GOMES CORDEIRO

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DO LAMBARI *Astyanax bimaculatus*
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE).**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido a
Faculdade de Biologia da Universidade Federal do
Sul e Sudeste do Pará como parte do requisito para
a obtenção de grau de bacharela em Ciências
Biológicas.

Orientador (a): Prof. Dr. Diógenes Henrique de
Siqueira Silva.

Marabá - PA
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Setorial Campus do Tauarizinho

Cordeiro, Jhennifer Gomes

Biologia reprodutiva do Lambari *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: characidae) / Jhennifer Gomes Cordeiro ; orientador, Diógenes Henrique de Siqueira Silva. — Marabá : [s. n.], 2018.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas, Faculdade de Biologia, Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Marabá, 2018.

1. Lambari (Peixe). 2. Peixe - Histologia. 3. Peixes - Reprodução. I. Silva, Diógenes Henrique de Siqueira, orient. II. Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará. III. Título.

 Captura Retangular

CDD: 22. ed.: 597.0929

Elaborada por Alessandra Helena da Mata Nunes – CRB-2/586

A Deus por ser meu porto seguro
e a minha família, em especial meus
pais por todo carinho e cuidado
durante essa jornada tão árdua.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder tantas oportunidades de crescer e encontrar o meu lugar.

Ao meu orientador prof. Dr. Diógenes Henrique de Siqueira-Silva, sou grata por cada ensinamento, cada exortação, cada momento passado durante esse tempo em que tenho sido orientada por você. Com toda a minha admiração, não poderia ter feito escolha melhor, obrigada por compartilhar parte do seu conhecimento comigo, espero que esse seja só o início da nossa parceria e amizade.

Ao CNPq e a PROPIT pela bolsa de Iniciação Científica.

A Fundação Zoobotânica de Marabá em nome de Ananis e Edna, muito obrigada pelo apoio e por permitir a ocorrência das coletas.

Ao Laboratório de Biotecnologia / CEPTA - Pirassununga – SP, ao prof. Dr. George Shigueki Yasui, obrigada por abrir espaço para mim no seu laboratório e por todo apoio e suporte, estou ansiosa pela nossa futura parceria. A Rafaela que se dispôs a me ensinar as técnicas histológicas, Nivaldo, Hatus, Dilberto, Nycolas, Natália, Gustavo, Lauriene, Bruna, Talita, Lucía, Natalia Matheus e em especial a Geovana que me recebeu durante tantos dias, obrigada pela amizade e parceria.

Ao Grupo de Biologia Reprodutiva e Molecular - Instituto de Biociências de Botucatu (IBB - UNESP) em nome do prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega, muito obrigada por me receber em seu laboratório e disponibilizar a sua equipe, em especial a Maira, para me ensinar os procedimentos histológicos e tantas outras coisas que tive a oportunidade de aprender. Maira, muito obrigada pela recepção e pelo cuidado comigo durante esse processo, você é uma joia, espero poder retribuir.

Ao Wellington Adriano Moreira Peres pelo belíssimo mapa.

Ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, SP em nome dos pesquisadores Felipe Pontieri de Lima, Diogo Freitas Souza e Prof. Claudio de Oliveira, pela identificação da espécie.

À Renata Egger pela ajuda nos procedimentos histológicos.

A toda a equipe de coleta, Sargento Dias, Maria Antônia, Juan, Edson, Wilson Jr., Luiz, Matheus, Rodrigo, Camila, GERPA, e em especial aos guias Carlos e Renan, muito obrigada, sem a ajuda de vocês este trabalho não seria possível.

A todos os integrantes do Grupo de Estudos da Reprodução de Peixes Amazônicos – GERPA, em especial Raquel, Jeane, Marisol, Bruna e Gabriel, vocês são mais que parceiros de trabalho, são amigos de vida.

Ao Laboratório de Neurociência e Comportamento Frederico Graeff (LaNeC) – Unifesspa/UEPA e a toda a esquipe, não tenho palavras para expressar minha gratidão, vou levar sempre comigo tudo o que aprendi com cada um, em especial prof. Dr. Caio Maximino, obrigada por me receber e por ser tão cuidadoso com todos nós, você me ensinou muito durante esse tempo, serei sempre grata.

Aos meus colegas de turma, CBio 2015, vocês são os melhores, tenho uma admiração especial por cada um e sei que vão chegar longe. Obrigada por esses anos.

À todos os docentes da FACBIO que sempre deram o seu melhor para nos ensinar e ajudar.

A FACBIO e a Unifesspa pela oportunidade de formação profissional e pela estrutura.

Agradecimentos especiais

Aos meus pais, Eduardo Gomes da Silva e Maria das Graças Gomes Cordeiro, obrigada pelo amor e carinho, por sempre me apoiar e me ajudar em cada momento dessa fase, sem vocês, de fato, eu nunca teria conseguido. Sou grata por cada ensinamento e por todo esforço que vocês tiveram para me criar e educar, afinal, o que aprendi com vocês, universidade nenhuma poderia me ensinar. Pai, obrigada por ser meu maior financiador, obrigada por acreditar nos meus sonhos e me ajudar, eu sei que é pesado e difícil, mas um dia eu sei que vou poder retribuir tudo isso. Mãe, obrigada por me amar e cuidar tanto de mim, espero um dia poder retribuir e te compensar por tudo que já fez por mim. Eu amo muito vocês.

As minhas irmãs Sabrina e Rebeca, vocês também são parte dessa conquista, eu amo vocês.

Aos meus familiares, tios e tias, avôs e avós que sempre acreditaram em mim e torceram pelo meu sucesso, amo vocês.

Aos meus amigos do Tacho, Juan, Wenderson, Elis, Thalyta, Camila, Marcy, Danny e Lorena, obrigada por cada momento vivido, por cada risada e cada choro compartilhado. Vocês fizeram dessa jornada, incrível. Eu amo cada um de vocês de uma maneira especial, desejo sucesso e grandes oportunidades, sei da capacidade de vocês e espero ver cada um brilhando.

A minha amiga Natalia Oliveira, obrigada por estar comigo nesses 9 anos, sei que de todas as pessoas, com você posso sempre contar. Te amo.

“A grandeza vem não quando as coisas sempre vão bem para você, mas a grandeza vem quando você é realmente testado, quando você sofre alguns golpes, algumas decepções, quando a tristeza chega. Porque apenas se você esteve nos mais profundos vales você poderá um dia saber o quão magnífico é se estar no topo da mais alta montanha.”

- **Richard Milhous Nixon**

RESUMO

Os peixes são organismos aquáticos que compõem mais da metade dos vertebrados vivos da atualidade, sendo que os teleósteos representam cerca de 96% destes. Com tamanha diversidade de espécies, diferentes estratégias para sobrevivência foram desenvolvidas, tais como cuidado parental, ovos adesivos e outras. Dentre estas, as estratégias reprodutivas têm sido alvo de muitos estudos e a histologia tem sido empregada como uma ferramenta eficiente para o conhecimento da dinâmica reprodutiva das espécies. Esta ferramenta tem sido utilizada em estudos relacionados ao período reprodutivo, acompanhamento do desenvolvimento gamético desde as células primordiais germinativas (CPGs) até a formação dos gametas. Em machos a formação dos espermatozoides é denominada espermatogênese. Esta tem início a partir de uma única célula conhecida como espermatogônia indiferenciada, sendo didaticamente dividido em três fases: Fase proliferativa, cujas espermatogônias passam por divisões mitóticas; fase meiótica, em que os espermatócitos passam por duas divisões meióticas sucessivas e; espermiogênese, em que as espermárides passam por sucessivas modificações morfofisiológicas para formação dos espermatozoides. Em fêmeas processo é denominado de oogênese, que também se divide em três fases: Crescimento primário; crescimento secundário e; vitelogênese, que determinam o processo de formação do óvulo maduro. Ainda que esses processos tenham princípios comuns, cada espécie apresenta suas peculiaridades, sendo provenientes, principalmente, das adaptações desenvolvidas ao longo do tempo e de acordo com as condições ambientais em que vivem. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar a biologia reprodutiva da espécie *Astyanax bimaculatus* coletadas em riachos Amazônicos.

Palavras-chaves: Espermatogênese. Estratégias reprodutivas. Gametogênese. Oogênese. Reprodução.

ABSTRACT

Fish are aquatic organisms that make up more than half of today's living vertebrates, with about 96% of them being teleosts. With such a diversity of species, different strategies for survival were developed, such as parental care, adhesive eggs and others. Among them, reproductive strategies have been target of many studies and histology has been used as an efficient tool for the knowledge of the reproductive dynamics of the species. This tool has been used in studies related to the reproductive period, monitoring the gametic development from primordial germ cells (PGCs) to the formation of gametes. In males sperm formation is termed spermatogenesis. This starts from a single cell known as A undifferentiated spermatogonia, being divided into three phases: proliferative phase, in which spermatogonia pass through mitotic divisions; meiotic phase, in which the spermatocytes pass through two successive meiotic divisions and; spermiogenesis, in which spermatids undergo successive morphophysiological modifications to sperm formation. In females the process is termed oogenesis, which is also divided into three phases: Primary growth; secondary growth and; vitellogenesis, which determine the process of formation of the mature oocyte. Although those processes have common principles, each species presents its peculiarities, coming mainly from the adaptations developed over the time and according to the environmental conditions in which they live. Thus, the present work aimed to characterize the reproductive biology of the species *Astyanax bimaculatus* collected in Amazonian streams.

Keywords: Gametogenesis. Oogenesis. Reproduction. Reproductive strategies. Spermatogenesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Gametogênese.....	10
1.2	Espermatozóides.....	11
1.3	Oogênese	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Geral.....	17
2.2	Específicos	17
3	MATERIAL E METÓDOS.....	18
3.1	Local de coleta.....	18
3.2	Coleção de amostras	21
3.3	Caracterização histológica	23
3.4	Estatísticas	24
	REFERÊNCIAS	25
	CAPÍTULO 1	29
	Reproductive cycle of the tetra <i>Astyanax bimaculatus</i> (Characiformes: Characidae) collected in Amazonian streams	29
	Summary.....	30
	Introduction	31
	Material and Methods	32
	Results	34
	Discussion.....	41
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
	ANEXO A – Página do periódico de submissão do manuscrito.....	49

1 INTRODUÇÃO

Os peixes são organismos aquáticos que compõem mais da metade dos vertebrados vivos da atualidade (NELSON *et al.*, 2016), possuindo importância econômica, ecológica e cultural (VOLFF, 2005). Dentre eles, os Teleósteos representam cerca de 96% das espécies conhecidas, podendo habitar os mais distintos ambientes, graças ao desenvolvimento de um extenso repertório de estratégias reprodutivas, que visam sua adaptação e sucesso reprodutivo (VAZZOLER, 1996).

Estas estratégias e adaptações são alvo de muitos estudos, tais como o tipos de fecundação (externa ou interna), desenvolvimento embrionário e larval, que determina o tempo que a espécie leva desde o momento da fecundação até o período de alimentação exógena , características dos ovos, que podem ser adesivos, lisos, pequenos, grandes, dentre outras, que são características intimamente associadas a presença ou ausência de cuidado parental, primeira maturação, fator de condição (que indica o bem estar do peixe com base nas condições alimentares), e o período reprodutivo, que pode ser indicado macroscopicamente a partir do índice gonadossomático, necessitando, entretanto, do auxílio da histologia para uma análise morfológica das gônadas mais precisa. Esta ferramenta permite acompanhar o desenvolvimento gametogênico e a morfologia estrutural da gônada, determinando o período de possível reprodução da espécie estudada. Além disso, a histologia auxilia no entendimento de outras características, tais como o tipo de desenvolvimento oocitário (VAZZOLER, 1996), tipo testicular e de distribuição das espermatogônias (PARENTI; GRIER, 2004; SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2017), e a morfologia espermática (MATTEI, 1970; SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2012).

1.1 Gametogênese

As células precursoras da gametogênese, conhecidas como células germinativas primordiais (PGCs) são especificadas em regiões diferentes àquelas de formação das gônadas (DOITSIDOU *et al.*, 2002). Após sua especificação, elas migram em direção à futura região gonadal (SAITO *et al.*, 2014) diferenciando-se em espermatogônias ou oogônias, a depender principalmente do ambiente somático, mas que também pode sofrer influências das próprias células germinativas (FUJIMOTO *et al.*, 2010). No caso dos machos, as células germinativas proliferam e diferenciam-se em espermatogônias, dando início ao desenvolvimento testicular. As células somáticas presentes são nomeadas células pré-Sertoli e vão dar origem as células de

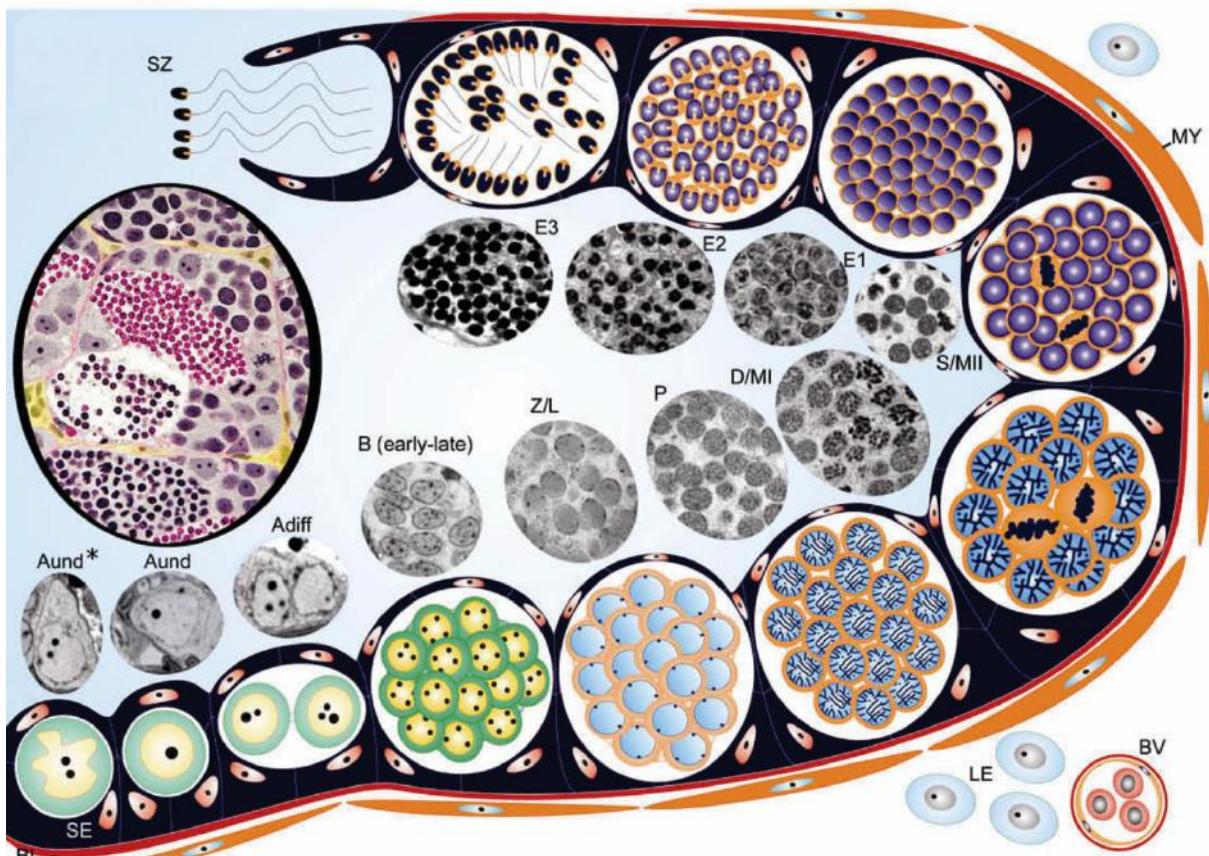
Sertoli que possuem grande importância no processo da espermato-gênese. Estas oferecem suporte as células germinativas durante todo o desenvolvimento, além de secretarem o fluido que forma o lúmen e também realizar o processo de fagocitose auxiliando na manutenção do testículo (SCHULZ *et al.*, 2009). No caso das fêmeas as PGCs se diferenciam em oogônias e as células somáticas em células pré-foliculares (MAZZONI, 2013). Com o avanço do desenvolvimento gonadal, a espermato-gênese ou oogênese tem início, cada um dos processos apresentando suas próprias peculiaridades, com, no entanto, alguns princípios comuns (SCHULZ *et al.*, 2009).

1.2 Espermato-gênese

A maioria dos testículos são órgãos pares, filiformes e localizados dorsalmente a cavidade celomática (FRANÇA, 2010). São circundados por uma túnica albugínea que emite septos e divide o parênquima em compartimento intersticial e germinativo (SIQUEIRA-SILVA; RODRIGUES; NÓBREGA, 2018) onde se dá o processo de espermato-gênese.

A espermato-gênese tem início com as células de Sertoli cercando, individualmente, espermato-gônias do tipo A indiferenciadas, que passam a se proliferar pelo processo de mitose. Neste momento, as células de Sertoli englobam as espermato-gônias A diferenciadas formando os cistos, dando início a fase cística do processo. As espermato-gônias A diferenciadas continuam a se dividir por mitose, formando as espermato-gônias do tipo B, até a diferenciação em espermato-citos primários. O número de divisões mitóticas das espermato-gônias até a formação dos espermato-citos é espécie específico (VILELA *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2017; SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2017). Os espermato-citos primários iniciam a divisão meiótica I, dando origem aos espermato-citos secundários, que passam pela meiose II, formando as espermátides. A partir deste momento não há mais divisões celulares e as espermátides passam apenas por um processo de diferenciação, denominado espermato-gênese, que envolve a eliminação de citoplasma residual, formação de flagelo, condensação da cromatina, entre outros eventos que culminam com a formação dos espermatozoides (GRIER; ARANZABAL, 2009). Os espermatozoides podem ser totalmente formados no interior dos cistos, sendo então liberados no lúmen testicular (Fig. 1). Este processo é conhecido como espermato-gênese cística (GRIER; TAYLOR, 1998). Em contrapartida, os cistos podem se romper antes da formação completa dos espermatozoides, liberando espermato-citos e/ou espermátides na luz testicular para aí então completarem sua diferenciação. Esta espermato-gênese é denominada semi-cística (MUÑOZ; CASADEVALL; BONET, 2002).

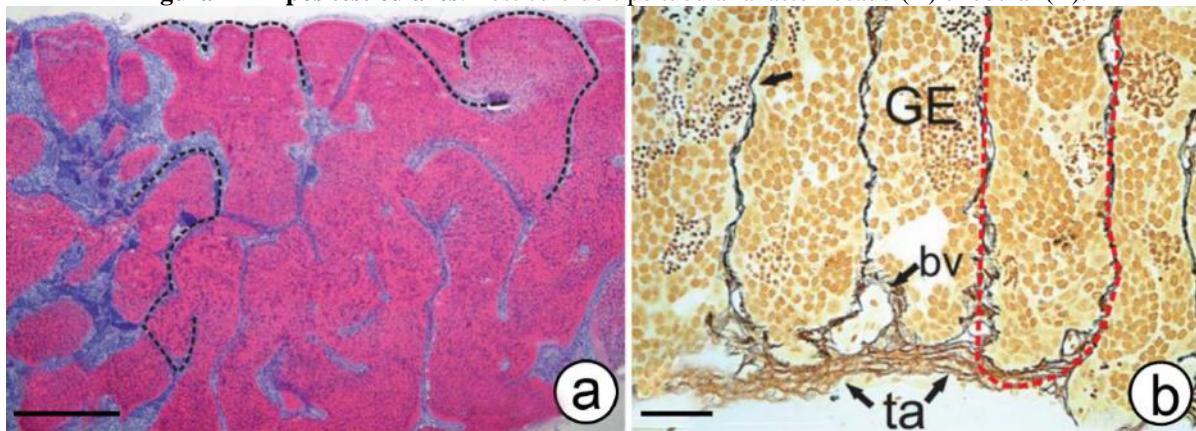
Figura 1 - Espermatogênese cística na espécie de peixe *Danio rerio*. O epitélio germinativo contém Sertoli (SE) e células germinativas, delineadas por uma lâmina basal (BL) e células mióide peritubulares (MY). As células intersticiais de Leydig (LE) e vasos sanguíneos (BV) são mostrados. Espermatogônia tipo A indiferenciada (Aund *); Espermatogônia indiferenciada tipo A (Aund); Espermatogônia tipo A diferenciada (Adiff); Espermatogônias tipo B (B); espermatócitos (Z/L; P; D/MI); Espermatídes (E1; E2; E3); espermatozoides (SZ).



Fonte: Adaptado de SCHULZ *et al.*, 2009.

Os testículos dos peixes também podem ser caracterizados como tubular anastomosado, presentes nas espécies filogeneticamente mais basais, tais como o *Astyanax altiparanae* (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2017) (Fig. 2a), sendo definido pela formação anastomoses ou ramos em seu epitélio germinativo (PARENTI; GRIER, 2004), e o tipo lobular, que é encontrado em espécies mais derivados, tais como os Neoteleósteos, caso do tucunaré *Cichla kelberi* (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2013), em que o epitélio germinativo termina na periferia do testículo, formando lóbulos (Fig. 2b).

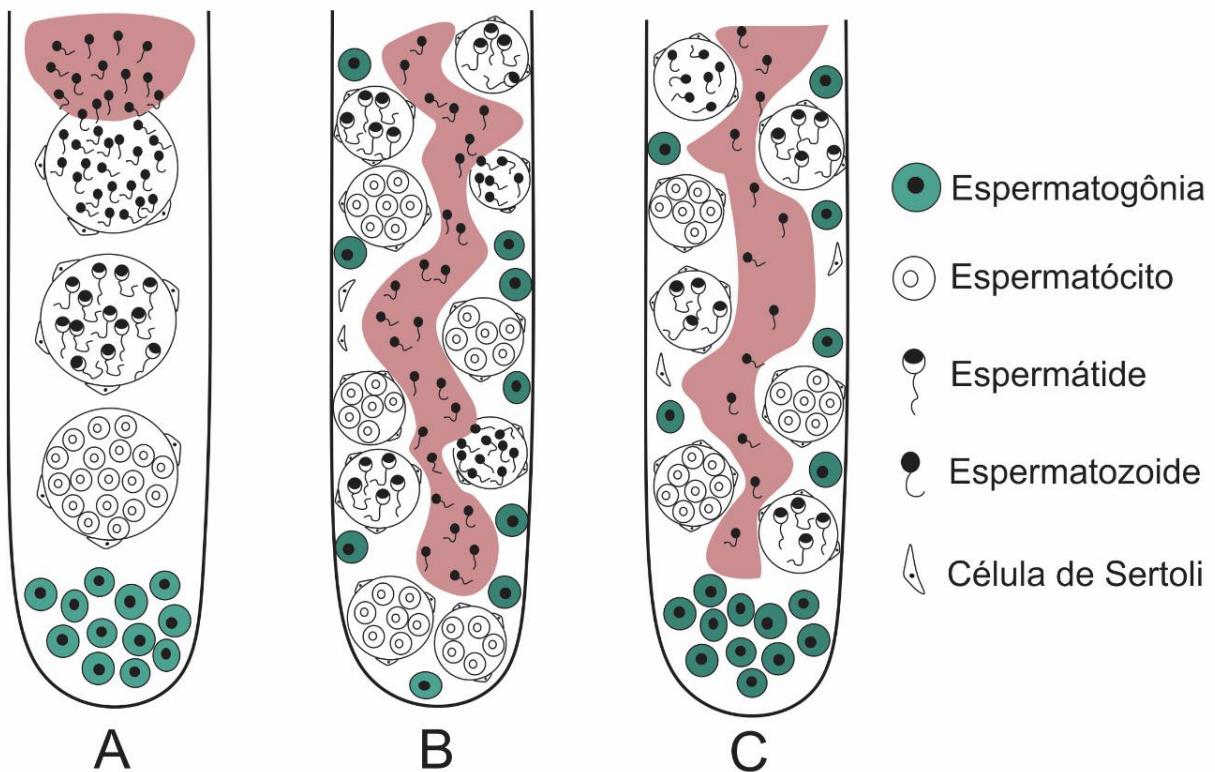
Figura 2 – Tipos testiculares. Testículo do tipo tubular anastomosado (A) e lobular (B).



Fonte: Adaptado de SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2018.

A distribuição das espermatogônias pelo epitélio germinativo também difere entre as espécies. Estas células podem estar restritas à periferia do epitélio germinativo, próximo a túnica albugínea (SCHULZ *et al.*, 2009) (Fig. 3a); podem estar distribuídas ao longo de todo o epitélio germinativo (GRIER; ARANZABAL, 2009) (Fig. 3b); ou estarem preferencialmente situadas na região periférica, mas encontrarem-se distribuídas ao longo do epitélio (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2013). Os testículos desses animais são denominados, espermatogonal restrito, espermatogonal irrestrito e parcialmente restrito, respectivamente.

Figura 3 – Distribuição espermatogonal, restrita (A), parcialmente irrestrita (B) e irrestrita (C).



Fonte: Jhennifer Gomes Cordeiro, 2019.

1.3 Oogênese

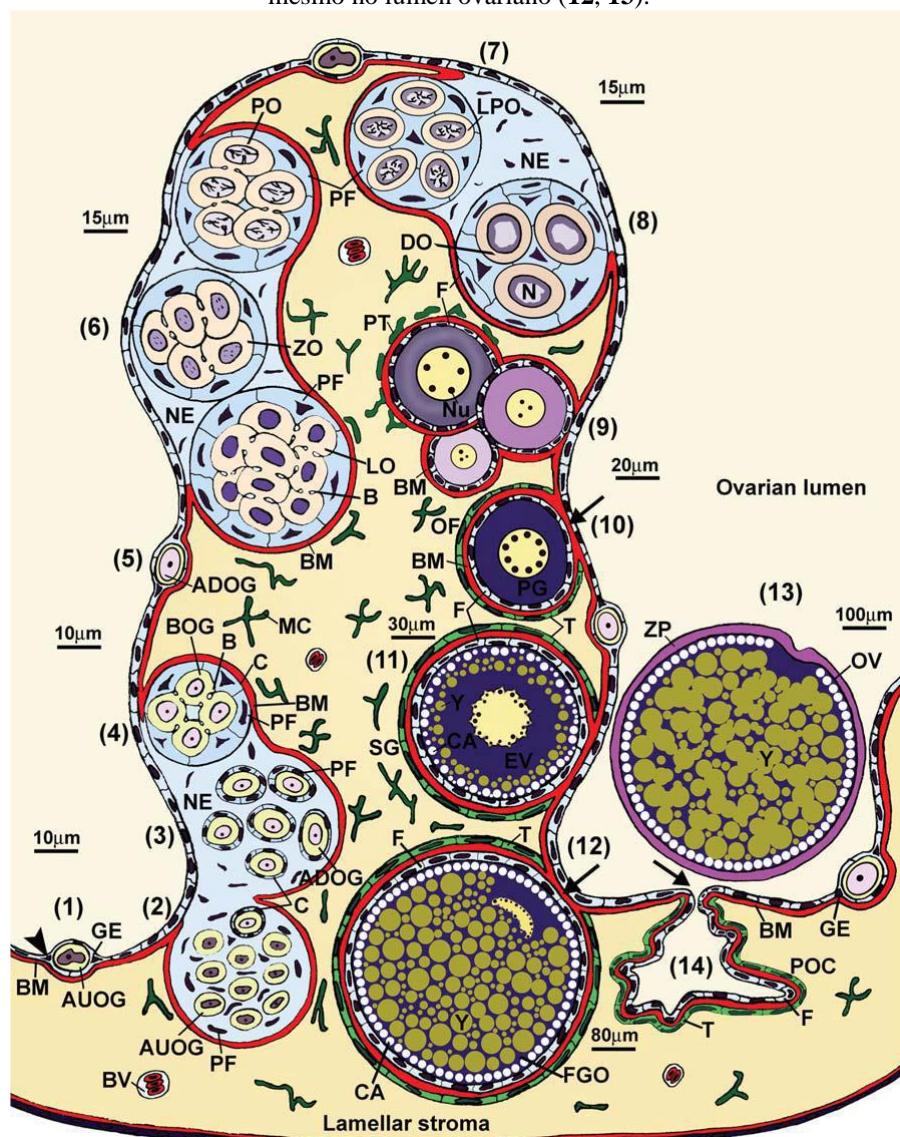
Os ovários possuem compartimentos que são constituídos de epitélio germinativo. Eles podem ser chamados de lamelas ovulígeras, a quais projetam-se em direção ao lúmen ovariano. É nas lamelas que ocorrem os processos da oogênese, desde a formação das oogônias que são as células iniciais, até os oócitos vitelogênicos prontos serem liberados na cavidade ovariana (JALABERT, 2005).

As oogônias são as células que dão início a oogênese e estão sempre em proliferação por sucessivas divisões mitóticas (JALABERT, 2005). Elas foram caracterizadas em três tipos na espécie da família Characidae *Lataecara araguaiae*, oogônias A-indiferenciada, A-diferenciada e oogônias B (SANTOS-SILVA *et al.*, 2015), que diferem-se morfologicamente pelo grau de condensação da cromatina e formato do núcleo (Fig. 4 [1-6]). A formação dos oócitos tem início com a diferenciação das oogônias, que entram na meiose e depois passam por um crescimento considerável no processo de vitelogênese a qual acumulam reservas nutricionais que auxiliarão no desenvolvimento da prole até que estes se alimentem de forma exógena (LUBZENS *et al.*, 2010). Os oócitos em crescimento primário possuem núcleo volumoso, e um citoplasma basofílico, e são circundados por uma camada de células foliculares pavimentosas (Fig. 4 [7-9]). É característica dessa fase a produção de RNA ribossômico que é sintetizado pelos vários nucléolos que se fazem presentes (WOURMS, 1976; GRIER, 2002) (Fig. 4 [10]). Com o desenvolvimento da fase aparecem os alvéolos corticais, que segundo Bazzoli *et al.* (1996) são estruturas vacuoladas, com a presença de glicoproteínas neutras, que ocorrem na periferia do citoplasma do oócio. Sua presença está relacionada a formação de uma barreira à polispermia (Fig. 4 [11]).

Conforme ocorre o desenvolvimento oocitário, inicia-se a deposição de vitelo no citoplasma do oócio. Neste momento tem início o estágio de crescimento secundário. As células que estão nesta fase possuem tamanho e volume maior que na fase inicial, sendo que agora o citoplasma ganha maior volume que o núcleo. Na periferia dos oócitos em crescimento secundário estão presentes, da região mais externa para a mais interna, as células da camada folicular, que é formada por um epitélio simples de células cuboides (SANTOS-SILVA *et al.*, 2015), as camadas da teca externa e teca interna e a zona radiata, que dará origem ao córion. O transporte da vitelogenina para formação do vitelo, ocorre pelo espaço intercelular, formando-se pequenos aglomerados vitelínicos na periferia do citoplasma. Estes avançam progressivamente entre os alvéolos corticais que nesta fase já se proliferaram bastante (FRANÇA; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2010) (Fig. 4 [10-11]).

No estágio de vitelogênese ocorre um grande acúmulo de grânulos de vitelo no citoplasma do oócito, que acumula proteínas, lipídios, carboidratos e vitaminas que são importantes para o desenvolvimento adequado do embrião (LUBZENS *et al*, 2010). Concomitante a esse acúmulo energético, ocorre a migração do núcleo ou vesícula germinativa para o polo animal em direção a micrópila, marcando o momento em que o oócito torna-se apto a fertilização (Fig. 4 [12-13]).

Figura 4 – Oogênese na espécie de peixe *Pimelodus maculatus*. Desenvolvimento inicial das oôgonias (1, 2, 3, 4, 5, 6); Formação dos oócitos iniciais com núcleos perinucleolares, circundados pela camada de células foliculares (7, 8, 9, 10); Desenvolvimento secundário com a presença de alvéolos corticais e deposição de vitelo (11); Oócitos em desenvolvimento final (vitelogênese) com maior deposição de grânulos de vitelo e liberação do mesmo no lúmen ovariano (12, 13).



Fonte: Adaptado de QUAGIO-GRASSIOTTO *et al*, 2011.

Com o conhecimento dos diferentes estágios de desenvolvimento oocitário é possível determinar de que forma as espécies se comportam em relação a reprodução, podendo definir seu tipo de desova. Vazzoler (1996) descreve que essas células podem se desenvolver de duas formas principais. A primeira é o desenvolvimento sincrônico, onde todos os oócitos alcançam a maturação no mesmo período, sendo liberados em uma única desova (desova total). O desenvolvimento sincrônico pode também ocorrer em grupos, sendo que cada lote de oócitos se desenvolvem de forma sincrônica diferenciando apenas o estágio de maturação em diferentes lotes. A desova ocorre a medida que os lotes mais desenvolvidos alcançam a maturação. Nesse tipo de desenvolvimento a desova ocorre em um mesmo período reprodutivo, em momentos sucessivos, podendo a desova ser considerada total, dentro do período reprodutivo, ou parcelada, se considerado os eventos reprodutivos sucessivos. Em contrapartida, em algumas espécies, os oócitos se desenvolvem em estágios distintos, sendo liberados à medida que atingem o estágio de maturação. Este tipo de desenvolvimento é conhecido como assincrônico e a desova é denominada parcelada, podendo ocorrer em várias oportunidades ao longo do ano.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar a biologia reprodutiva da espécie de peixe amazônica *Astyanax bimaculatus*, coletada em riachos da Fundação Zoobotânica de Marabá – PA.

2.2 Específicos

- Estimar os índices gonadossomático e hepatossomático
- Caracterizar a estrutura testicular e ovariana;
- Definir o ciclo gonadal de machos e fêmeas;
- Definir o ciclo reprodutivo da espécie nesta região.

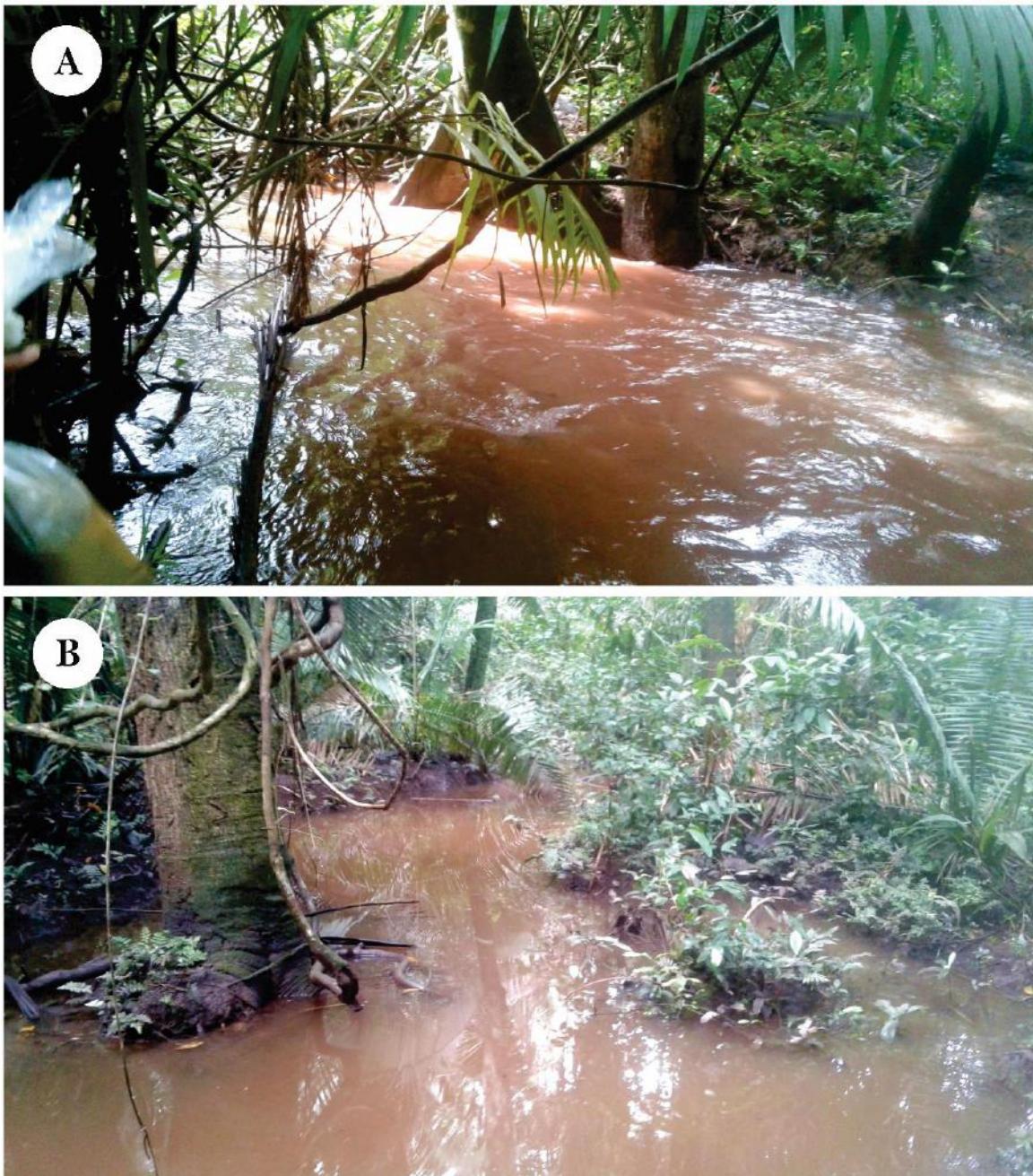
3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 Local de coleta

As coletas foram realizadas em pequenos riachos de água doce no interior da floresta Amazônica na “Fundação Zoobotânica de Marabá - PA”, que perfazem uma área de 15.650 m² (Fig. 1). O perímetro de amostragem foi demarcado no ponto 1 (S 05 ° 23'24,5 - W 049 ° 03'03,9), ponto 2 (S 05 ° 23'27,9 - W 049 ° 03'07,6), ponto 3 (S 05 ° 23`31,6 - W 049 ° 03 »12.3), ponto 4 (S 05 ° 23`32.2 - W 049 ° 03`13.3), ponto 5 (S 05 ° 23`51.6 - W 049 ° 04`08.0) e ponto 6 (S 05 23.06.0 - W 049 04.07.7). As coletas foram realizadas de acordo com a autorização do ICMBio (nº 62027-1) e os vouchers da espécie foram depositados na Coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no município de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil (comprovante: 25623).

Os riachos amazônicos são distintos, alguns apresentando fluxo mais rápido de água (água lóticas) (Fig. 5A) e outros baixa circulação de água (água lênticas) (Fig. 5B). Além disso, eles diferem por profundidade (~ 0,5 - 1,5 m), turbidez, penetração solar (1,25 - 1,45 m, disco Secch), quantidade de matéria orgânica dissolvida (Fig. 6). Além disso, devido ao regime hídrico desta região, com a redução significativa das chuvas entre meados de maio e o final de outubro, muitos desses córregos secam totalmente neste período (Fig. 7).

Figura 5 - Pontos de coleta evidenciando o fluxo da água: (A) águas lóticas; (B) águas lênticas.



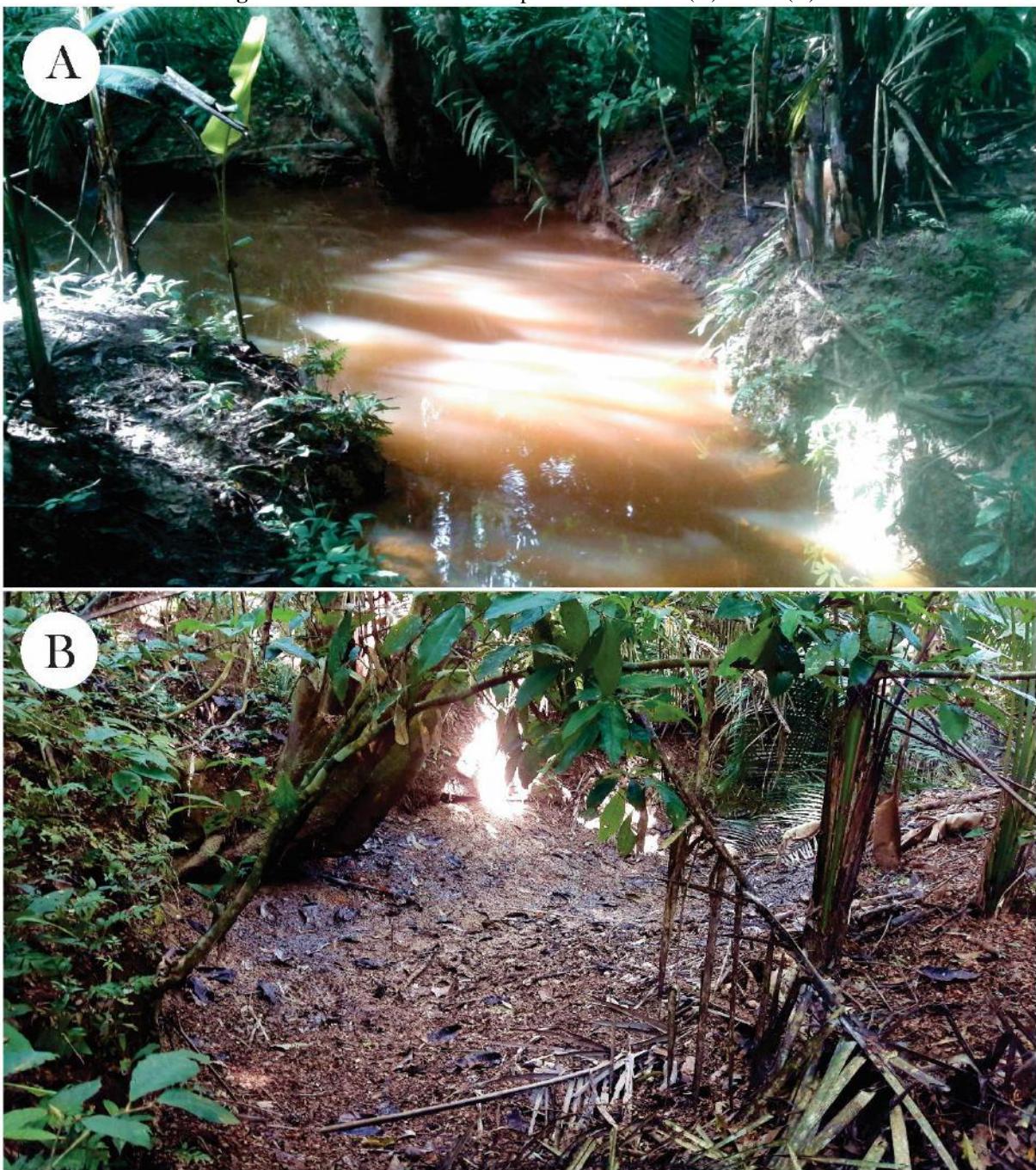
Fonte: Autor do trabalho.

Figura 6 - Turbidez da água nos pontos de coleta.



Fonte: Autor do trabalho.

Figura 7 - Ponto 2 de coleta nos períodos de cheia (A) e seca (B).



Fonte: Autor do trabalho.

3.2 Coleção de amostras

Inicialmente conduziu-se uma coleta piloto para definição da espécie a ser trabalhada. A escolha de *Astyanax bimaculatus* se deu principalmente pela quantidade de indivíduos que foram coletados (Fig. 8) e pela importância ecológica, e potencial econômico e turístico.

Definida a espécie, as coletas ocorreram mensalmente de agosto de 2017 a julho de 2018, com o auxílio de duas redes ($4,75 \times 1,10$ m) com malha de 1,0 x 1,0 mm que foram

utilizadas para a pesca de arrasto e espera (Fig. 9). Os espécimes amostrados foram levados ao laboratório em sacos plásticos com água dos riachos (Fig. 10).

Figura 8 - *Astyanax bimaculatus* em processo de biometria após coleta. **Barra de escala:** 1 cm.



Fonte: Autor do trabalho.

Figura 9 - Equipe de coleta realizando a pesca em arrasto.



Fonte: Autor do trabalho.

Figura 10 - Metodologia utilizada para o transporte dos peixes coletados.



Fonte: Autor do trabalho.

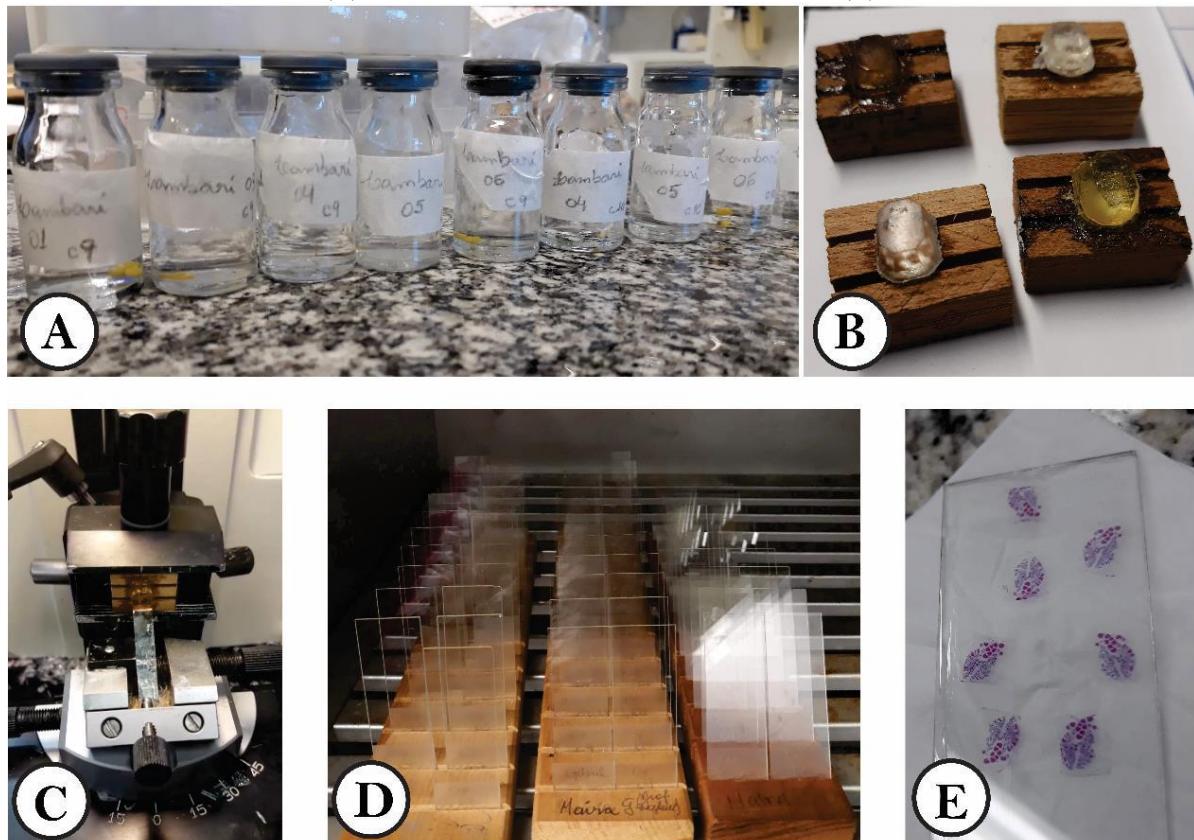
No laboratório os espécimes foram anestesiados em Eugenol ([20 ml de Eugenol Biodinâmico em 100 ml de Álcool Absoluto](#)) e submetidos à eutanásia. Dados biométricos, como comprimento total (TL, cm), comprimento padrão (SL, cm) e peso (W, g), foram aferidos.

Em seguida, foi feita uma incisão ventro-longitudinal em cada espécime, que tiveram suas gônadas e fígado removidos. O fígado foi pesado para avaliação do índice hepatossomático (HSI) pela fórmula $HSI = W_f / W_t * 100$ (W_f = peso do fígado; W_t = peso total do peixe). As gônadas foram pesadas para o cálculo do índice gonadossomático (GSI) com a fórmula $GSI = W_g / W_t * 100$ (W_g : peso da gôndola; W_t : peso total do peixe) e fixadas em solução de Bouin ([Cinética](#)) por 24 horas depois conservadas em álcool 70% para procedimento histológico.

3.3 Caracterização histológica

As gônadas fixadas passaram pelo processo de desidratação com passagens sucessivas em álcoois de graduação crescente (70, 80, 95°). Em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento de inclusão em metacrilato glicol ([historesin, Technovich, 7100](#)), que foi realizado em quatro passos: pré-infiltração, infiltração, inclusão e fixação em suporte de madeira (Fig. 11a-c). O material foi então cortado a 5 μm em um micrótomo ([Leica, 2200](#)) equipado com lâmina de vidro. As lâminas foram coradas em Azul de Toluidina e Hematoxilina e Eosina (Fig. 11d-e) e depois analisadas em microscópio óptico ([Leica CTR4000](#)). A fotodocumentação foi realizada com uma câmera digital ([Leica DFC310 FX](#)) e assistência do programa [Leica Application Suite 3.0.0 build 8134](#).

Figura 11 - Caracterização histológica: Inclusão em historesina (A); Blocos com amostras em resina (B) prontos para corte em micrótomo (C); Lâminas com os cortes histológicos no processo de secagem em estufa (D); Lâmina corada com Hematoxilina e Eosina (E).



Fonte: Autor do trabalho.

3.4 Estatísticas

Para analisar a proporção de machos e fêmeas, utilizou-se o teste do qui-quadrado (χ^2) com a hipótese de 1:1

REFERÊNCIAS

BAZZOLLI, N. *et al.* Dinâmica da ovogênese em peixes forrageiros da represa de Três Marias, Minas Gerais: estudo histológico e histoquímico. **BIOS, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas**, v. 4, p. 5 – 10, 1996.

DOITSIDOU, M. *et al.* Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. **Cell**, v. 111, n.5, p. 647-659, 2002.

FRANÇA, G. F. **Caracterização do epitelio germinativo das fêmeas e machos de *Gymnotus* sp., e perfil hormonal durante o ciclo reprodutivo (Teleostei; Ostariophysi, Gymnotiformes)**. 2010. 143 p. Tese (Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FRANÇA, G. F.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTO, I. A new vision of the origin and the oocyte development in the Ostariophysi applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei: Gymnotiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 8, p. 787 – 804, 2010.

FUJIMOTO, T., *et al.* Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 40, p. 17211-17216, 2010.

GRIER, H. J. *et al.* Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. **The American Journal of Anatomy**, v. 159, p. 331 – 345, 1980.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the commom snook. **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 521 – 542, 1998.

GRIER, H. J. Its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. **Aquatic Commons**, v. 53, p. 537 – 552, 2002.

GRIER, H. J.; M. C. U. ARANZABAL. The testis and spermatogenesis in teleost. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)**. Enfield: Science Publishers, 2009.

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

LUBZENS, E. *et al.* oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 367 – 389, 2010.

MATTEI, X. **Spermogène se compare à des poisson**. In: **Comparative spermatology**. B. Baccetti (Ed.). Academic Press, New York, pp. 57–70, 1970.

MAZZONI, T. S. **Formação do epitélio germinativo e diferenciação das estruturas gonadais: Uma análise comparativa entre grupos mais basais (Ostariophysi) e mais derivados (Atherinomorpha e Percomorpha) dentro de Teleostei**. 2013. 319 p. Tese (Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MUÑOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET, S. Testicular structure and semicystic spermatogenesis in a specialized oviparous species: *Scorpaena notata* (Pisces, Scorpaenidae). **Acta Zoologica**, v. 83, p. 213 – 219, 2002.

NELSON, J. S.; GRANDE, C. T.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the world**. 5. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016.

PARENTI, L. R.; GRIER, H. J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and Comparative Biology**, v. 41, p. 333 – 348, 2004.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I. *et al.* activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): germline cysts, follicle formation and oocyte development. **Journal of Morphology**, v. 272, p. 1290 – 1306, 2011.

RODRIGUES, M. S. *et al.* The efficiency of spermatogenesis and the support capacity of Sertoli cells in Characiformes. **Theriogenology**, v. 103, p. 149 – 152, 2017.

SAITO, T. *et al.* The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons. **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014.

SANTOS-SILVA, A. P. *et al.* Oogenesis in *Laetacara araguaiae* (Ottoni and Costa, 2009) (Labriformes: Cichlidae). **Zygote**, v. 24, p. 502 – 210, 2015.

SCHULZ, R. W. *et al.* Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 390 – 411, 2009.

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

SIQUEIRA-SILVA, D. H. *et al.* Reproductive cycle of the Neotropical cichlid yellow peacock bass *Cichla kelberi*: A novel pattern of testicular development. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, p. 587 – 596, 2013.

SIQUEIRA-SILVA, D. H. *et al.* Testicular structure and seminal pathway in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Characiforms: Characidae). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 46, p. 342 – 346, 2017.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; RODRIGUES, M. S.; NÓBREGA, R. H. Testis structure, espermatogonial niche and Sertoli cell efficiency in neotropical fish. **General and Comparative Endocrinology**, 2018.

VAZZOLER, A. E. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos:** teoria e prática. São Paulo: EDUEM - Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1996.

VILELA, D. A. R. *et al.* Spermatogenesis in teleost: Insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 1-4, p. 187-190, 2003.

VOLFF, J. N. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. **Heredity**, v. 94, p. 280 – 294, 2005.

WOURMS, J. P. Annual fish oogenesis. I. Differentiation of the mature oocyte and formation of the primary envelope. **Developmental biology**, v. 50, p. 338 – 354, 1976.

CAPITULO 1

**Reproductive cycle of the tetra *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae)
collected in Amazonian streams**

O presente manuscrito será subrido ao periódico *Zygote*.

Reproductive cycle of the tetra *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae) collected in Amazonian streams

Jhennifer Gomes Cordeiro¹, Jeane Rodrigues Rodrigues¹, Rafaela Manchin Bertolini², Rafael Henrique Nóbrega³, George Shigueki Yasui^{2,4}, Caio Maximino^{1,5}, Diógenes Henrique de Siqueira-Silva^{1,5}.

¹Group of Studies on the Reproduction of Amazon fish (GERPA/LANEC), Biology Faculty (FACBIO), University of South and Southern of Pará (Unifesspa), Marabá, Pará, Brazil; ²Laboratory of Fish Biotechnology, National Center for Research and Conservation of Continental Fish, Chico Mendes Institute of Biodiversity Conservation, Pirassununga, SP, Brazil; ³Reproductive and Molecular Biology Group, Department of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP) – Botucatu, Brazil; ⁴Department of Veterinary Medicine, FZEA, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil; ⁵PPG in Biodiversity and Biotechnology (BIONORTE).

Summary

This study performed the histological characterization of the gonadal development in male and females of the tetra *Astyanax bimaculatus* aiming the determination of its reproductive cycle in streams localized inside the Amazonian Forest. Collection were monthly carried out using nets during the period from August 2017 to July 2018 at the Zoobotânica Foundation of Marabá-PA. The collected specimens were weighed, measured and their gonads and liver were removed and weighed for the calculation of the gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic (HSI) indexes. The gonads were fixed in Bouin's solution for 24 hr and then maintained in 70% Alcohol for routine histological procedure for light microscopy. The samples were included in resin, and sections of 5 µm were performed in microtome equipped with a glass razor. The material were stained in Toluidine Blue and Hematoxylin and Eosin. The Amazonian *A. bimaculatus* species presented two reproductive periods in the year, one in the end of winter season and another during the summer. Females show an asynchronous development of their oocytes and only two reproductive phases of development were observed during the whole period: In Development and Spawning Capable. The males presented a cystic spermatogenesis, their testes were of the anastomosing tubular type with spermatogonia spread along the germinal epithelium (unrestricted spermatogonial). Those morphological characteristics are in accordance to other species of Characidae family and to the species, which as *A. bimaculatus* are considered more primitive in the phylogenetic scale. Male specimens were observed in five different phases during the period of collection: Immature, Initial Maturation, Mid Maturation, Final Maturation and Regression. In spite of the huge floatations of the Amazonian streams here studied, whose volume of waters considerable vary during the seasons, culminating even with the total dry of some of them, *A. bimaculatus* could be find in all the seasons, showing its huge reproductive adaptation to that situation.

Keywords: Fish, Morphology, Oogenesis, Reproduction, Spermatogenesis.

Introduction

Popularly known as “tambiú tetra”, *Astyanax bimaculatus*, is a fish species belonging to Characidae Family, which comprises most of the freshwater fish in Brazil. According to Frick *et al.* (2018), that family assemble approximately 1.177 valid species of fish. Among them, the species *A. bimaculatus* has been consider a long time as one of the most important of *Astyanax* gender (Vilela & Hayashi, 2001), due to its huge distribution, from the Brazilian Northeast to Prata basin, highlighting by its big amount of capture and its importance in the sportive fisherie (Barbieri *et al.*, 1982), besides to be the main items of diet of some fish species, as the “saicanga” (*Oligosarcus longirostris*), and the “traíra” (*Hoplias malabaricus*) (Andrian *et al.*, 2001).

Its adaptive plasticity is probably associated to the reproductive mechanisms and strategies developed during the life, allowing its reproduction and survival in the most varied locals, as lakes, dams, streams, swamps and rivers. For this reason, *A. bimaculatus* has been used as a biological model in toxicological studies (Santos *et al.*, 2015; Marcon *et al.*, 2017), substrates evaluation (Rezende *et al.*, 2005), hormonal induction (Felizardo *et al.*, 2011) and in studies of environmental impacts (Mereles *et al.*, 2017; Normando *et al.*, 2013). Moreover, the species has been target of many studies related to reproduction, such as embryo development (Weber *et al.*, 2012), larval development (Vilela & Hayashi, 2001), studies related to nutrition (Andrian *et al.*, 2001) and reproduction (Barbieri *et al.*, 1982; Santos *et al.*, 1991). However, none of those studies describes morphologically its gonadal development, as spermatogenesis, oogenesis and reproductive cycle.

One tool that has been used for the study of reproduction of many species, as the tetra *Astyanax altiparanae* (Rodrigues *et al.*, 2015; Cassel *et al.*, 2017), the Dânio *Devario aequipinnatus* (De Jesus-Silva *et al.*, 2017; Chagas *et al.*, 2016), besides some species of the Amazonian region as the Amazonian whitefish *Plagioscion squamosissimus* (Barbosa *et al.*, 2012) and the “piranha” *Serrasalmus gouldingi* (Prudente *et al.*, 2014), is the histology, which is considered one of the most accurate to analyses the features of the reproductive development in one species, since it allows the determination of the reproductive phases in males and females, defining, for example, time of first maturation, spawning type, reproductive period (Vazzoler, 1996) and fecundity (Mendes *et al.*, 2018). That knowledge is requisite to the comprehension of the species population performance, besides help in the conservation strategies and management of the organisms and their environment (Vazzoler, 1996), mainly in relation of species from Amazonian region in which the Rivers and lowlands pass through

periodic modification due to the flood cycle (Prudente *et al.*, 2015), modifying, thereafter, the reproductive aspects of the habitant species, which are intrinsically interlinked to the habitats (Godinho *et al.*, 2009).

Thus, considering the economic, tourist and ecological potential of the species, the objective of this study was the histological characterization of the gonadal development in male and females of *A. bimaculatus* aiming the determination of its reproductive cycle in streams localized inside the Amazonian Forest.

Material and Methods

Place of collection

The collections were made in accordance to ICMBio authorization (nº 62027-1), in small streams of freshwater opened inside the Amazon forest at the “Zoobotânica Foundation of Marabá – PA”, which rail an area of 15.650 m² (Fig. 1). Sampling perimeter was demarcated at point 1 (S 05 ° 23'24.5 - W 049 ° 03'03.9), point 2 (S 05 ° 23'27.9 - W 049 ° 03'07.6), point 3 (S 05 ° 23'31.6 - W 049 ° 03'12.3), point 4 (S 05 ° 23'32.2 - W 049 ° 03'13.3), point 5 (S 05 ° 23'51.6 - W 049 ° 04'08.0) and point 6 (S 05 23.06.0 - W 049 04.07.7). Voucher specimens (voucher number: 25623) were deposited in the Collection of the Fish Biology and Genetics Laboratory in the Institute of Biosciences Universidade Estadual Paulista (UNESP), municipality of Botucatu, São Paulo state , Brazil .

The Amazonian streams are distinct from each other, some presenting low water circulation (lentic waters) and others with a faster flow of water (lotic waters). In addition, they differ by depth (~ 0.5 - 1.5 m), turbidity, solar penetration (1.25 - 1.45 m, Secch disc) and amount of dissolved organic matter. Moreover, due to the water regime of this region, with the full stoppage of the rains between the middle of April and the end of October, many of those streams totally dry up.

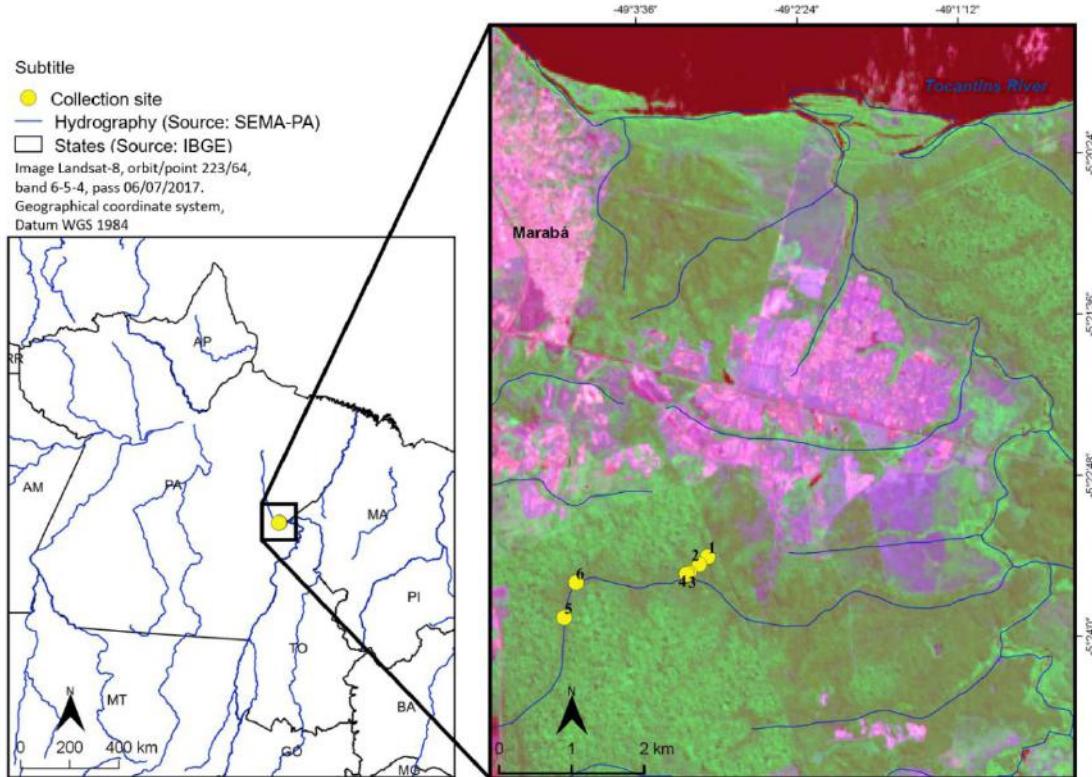


Figure 1. Collection points area at the Zoobotânica Foundation of Marabá - PA. Source: Wellington Adriano Moreira Peres.

Sample collection

The collections occurred monthly from August 2017 to July 2018, with the aid of two nets (4.75×1.10 m) with a mesh of 1.0×1.0 mm that were used for trawling and waiting. The sampled specimens were taken to the laboratory where they were anesthetized in Eugenol (20 ml of [Biodynamic](#) Eugenol in 100 ml Absolute Alcohol) and submitted to euthanasia. Biometric data, such as total length (TL, cm), standard length (SL, cm) and weight (W, g) were measured.

A ventro-longitudinal incision was made and the gonads and liver of each specimen were removed. The liver were weighed for evaluation of the hepatosomatic index (HSI) by the formula $HSI = W_f / W_t * 100$ (W_f = weight of the liver; W_t = total weight of the fish). The gonads were weighed to calculate the gonadosomatic index (GSI) with the formula $GSI = W_g / W_t * 100$ (W_g : weight of the gonad; W_t : total weight of the fish) and fixed in Bouin solution ([Cinetica](#)) for 24 h and then preserved in alcohol 70 % for histology procedure.

Histological characterization

All material was processed according to standard protocols for light microscopy analysis. The gonads were submitted to the inclusion procedure in methacrylate glycol ([historesin, Technovich, 7100](#)). The material was then cut at $5 \mu\text{m}$ in a microtome ([Leica, 2200](#))

equipped with a glass razor. The slides were stained with Toluidine Blue and Hematoxylin and Eosin and then analyzed under an optical microscope ([Leica CTR4000](#)). The photodocumentation was performed with a camera ([Leica DFC310 FX](#)) and assistance of the program [Leica Application Suite 3.0.0 build 8134](#).

Statistics

To analyze the proportion of males and females the chi-square test (χ^2) (level of 0.05% significance) was performed, hypothesizing a 1:1 ratio.

Results

A total of 35 specimens were collected, being 22 males and 13 females, representing an expected 1:1 sex ratio according to chi square test ($\chi^2 = 2.314$; $p = 0.05$). The female's standard length and weight were in media 5.9 ± 0.95 cm and 4.8 ± 2.78 g, respectively. In the male specimens, the standard length and weight were 5.0 ± 0.87 cm and 2.6 ± 1.76 g, respectively.

The Gonadossomatic Index (GSI) had three peaks during the sampling period. A slight one in September 2017 and two higher peaks in January and March 2018. Those peaks were followed by decreasing values of the GSI in the following months. The Hepatossomatic Index (HSI) followed the same tendency (Fig. 2).

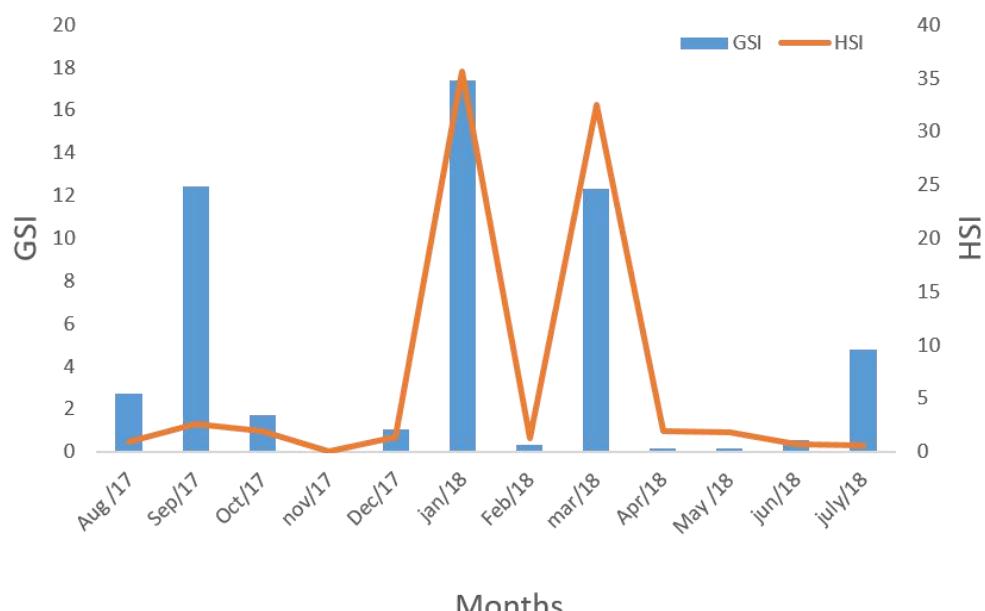


Figure 2. Relation of the Gonadossomatic (GSI) and Hepatossomatic (HSI) indexes during the 12 sampling months.

Females

The definition of the maturation phases in *A. bimaculatus* females were performed according to the description of De Jesus-Silva *et al.* (2018) to *D. aequipinnatus* species, using Brown-Peterson *et al.* (2011) as support. The sampled female specimens were identified in only two maturation phases, Developing and Spawning capable, as can be seen in Figures 3 and 4.

Developing

This maturation phases starts with the oocytes in primary growth. Most of the present cells are in the beginning and final of previtelogenic stage. The Initial previtelogenic cells are characterized by an acidophilic round nucleus and the presence of peripheral nucleolus. The cytoplasm is basophilic and those cells are smaller than the Final previtelogenic cells. Oogonia in different stage of development are also visualized (Fig. 3a-b). The previtelogenic oocytes in final stage of development are characterized by the appearance of cortical alveoli and the zona radiata. In addition, the cytoplasm becomes less basophilic (Fig. 3c-d). As the ovaries develop, the initial pre-vitelogenic cells are less observed and the final pre-vitelogenic cells become more and more apparent. Oocytes in secondary growth are now visible. Is it possible to observe on them the cortical alveoli and the beginning of yolk deposition. Oocytes in atresia (Fig. 3d) and post-ovulatory follicular complex (POC) are observed during this maturation phases (Fig. 3b).

Spawning capable

This phase is mainly characterized by the presence of vitellogenic oocytes, which can indicate that the individuals are able to reproduce. In this moment, in some oocytes, it is possible to observe the migration of the germinal vesicle in direction to the periphery (Fig. 3f). In spite of the vitellogenic oocytes occupy a big volume in the ovaries during this phase, Initial and Final pre-vitelogenic oocytes are still observed (Fig. 3e-f).

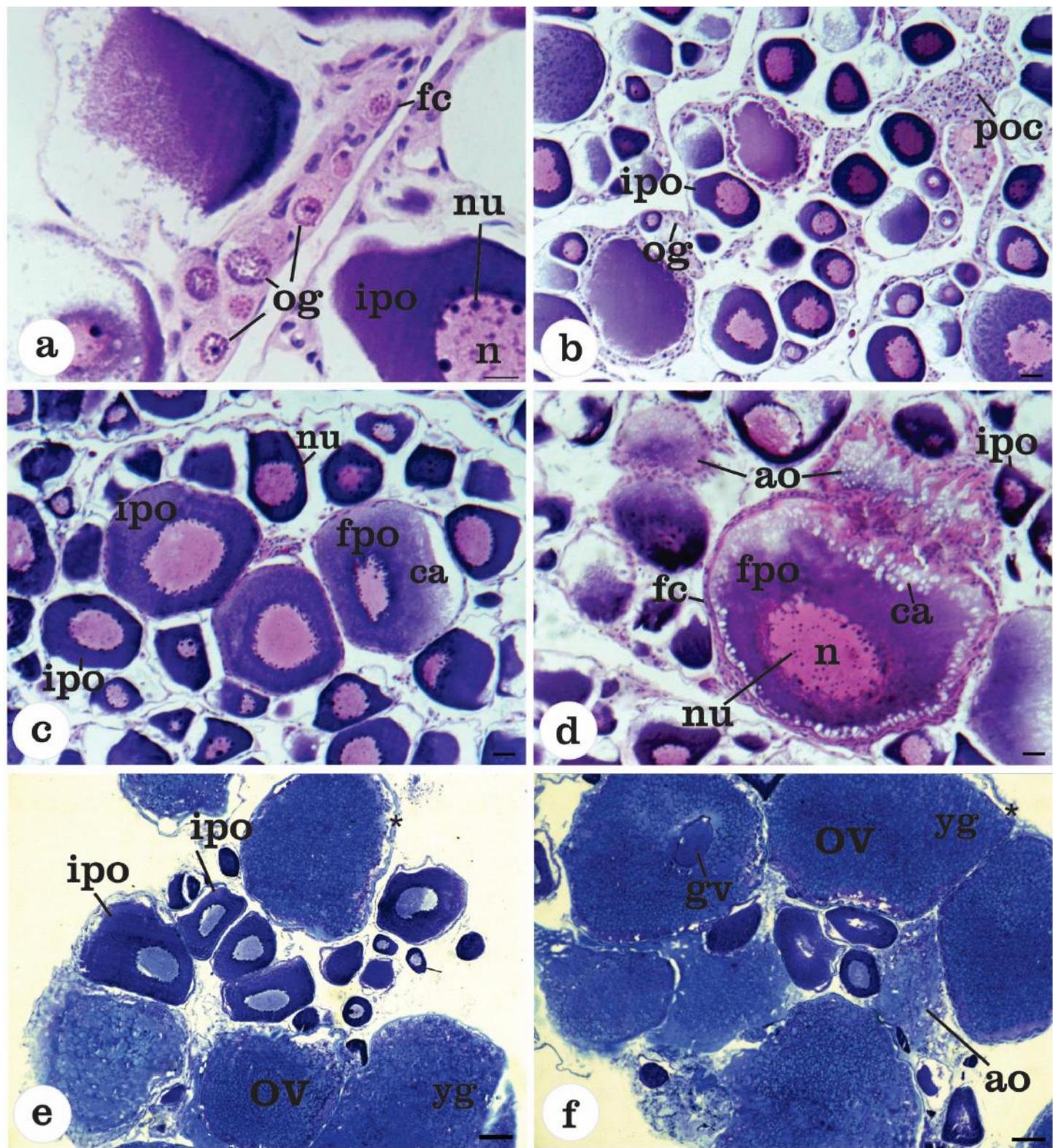


Figure 3. Oogenesis in *A. bimaculatus*. Developing: (a, b) initial pre-vitellogenic oocytes (*ipo*) with perinucleolar nucleoli (*nu*) and different Oogonia (*og*). Follicular cells are observed (*fc*); (c, d) initial pre-vitellogenic oocytes (*ipo*) and final pre-vitellogenic oocytes (*fpo*) with presence of cortical alveoli (*ca*) at the periphery. **Spawning capable:** (e, f) vitellogenic oocytes (*vo*) filled with yolk granules (*yg*) and germinal vesicular migration (*gv*). **Abbreviations:** *ao*: atresic oocytes; *poc*: post ovulatory follicular complex; *Asterisk (*)*: Zona radiate; *n*: nucleus. **Scale bar:** b: 50 µm; a, c, d, e, f: 100 µm. **Coloration:** a, b, c, d: Hematoxylin and eosin; e, f: Toluidine blue.

The animals were categorized according to their maturation status and subdivided throughout the seasons. Females suitable for spawning during winter and summer periods were observed (Fig.4).

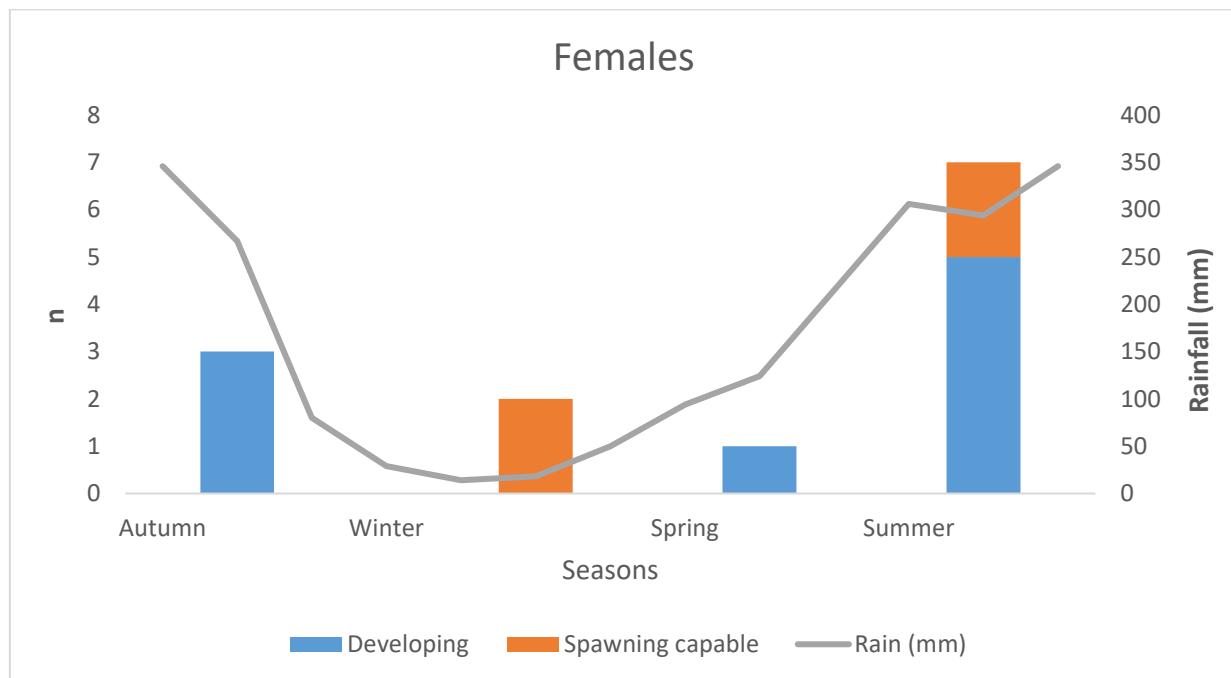


Figure 4. Gonadal development in females of *Astyanax bimaculatus* per season throughout of the year. Pluviometry data obtained from Climate-Data.org.

Males

The testes of *A. bimaculatus* males are of the anastomosing tubular type, showing spermatogonia spread along the entire length of the germinal epithelium (Fig. 5).

To the identification of the development phases in *A. bimaculatus* testes the description used by Siqueira-Silva *et al.* (2013) to the yellow peacock bass *Cichla Kelberi* was performed, using as basis the classification proposed by Grier & Taylor (1998). The necessary adaptations to *A. bimaculatus* species were made. The observed maturation phases for *A. bimaculatus* males were:

Immature

This phase is characterized by the intense presence of spermatogonia spread along the entire length of the testis and, consequently, the absent of lumen. The spermatogonia are the cells that initiate the spermatogenesis, as the development of these phases occurs other cells are being formed, and some spermatocytes can be visualized in its transition to Initial maturation (Fig. 5a-b).

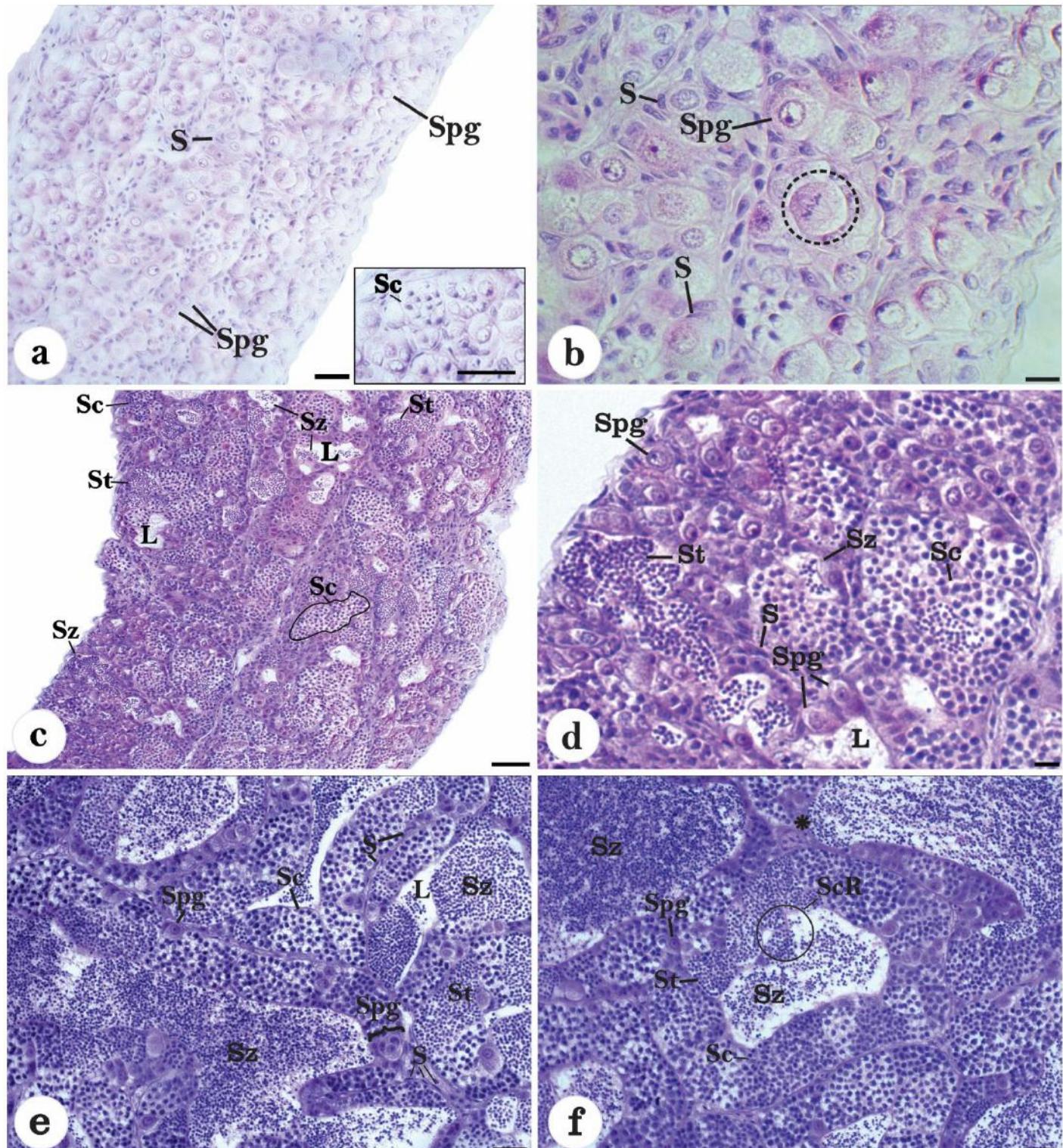


Figure 5. Spermatogenesis in *A. bimaculatus*. **Immature:** (a, b) Proliferation of spermatogonia (Spg) in the beginning of gonadal development. **Inset:** Spermatocyte cyst (Sc). **Initial maturation:** (c, d) spermatogonia (Spg), cysts of spermatocytes (Sc) and spermatids (St), and some spermatozoa (Sz) released in the lumen (L) can be observed and the germinal epithelium is still continuous. **Mid maturation:** (e, f) Persistence of many cysts of spermatocytes (Sc) and spermatids (St) and spermatic cyst rupture (ScR) releasing a big volume of spermatozoa (Sz) in the lumen (L). Discontinuity of the germinal epithelium are now observed Asterisk (*). **Abbreviations:** S: Sertoli cell; Dashed line (- - -): spermatogonia in mitosis. **Scale bar:** a, c, d, e, f, inset: 25 µm; b: 10 µm. **Coloration :** Hematoxylin and Eosin.

Initial maturation

In this phase, testes are characterized by the presence of a continuous germinal epithelium, in which it is possible to find a large volume of spermatogenic cysts in all development stages, but mainly those of spermatocytes. Many spermatogonia can be visualized spread along the epithelium and the lumen is already easily visualized (Fig. 5c-d).

Mid maturation

One of the main characteristics of this phase is the beginning of the discontinuity in the germinal epithelium, since many spermatocysts start their rupture (Fig. 5f) to release the spermatozoa in the lumen. Even with the rupture of some, many cysts and single spermatogonia are still observed. Spermatocyte cysts are still the most frequent in the testes (Fig. 5e-f).

Final Maturation

In this maturation phase, the individuals are ready to release the semen to the environment. It is characterized by an advancement in the discontinuity of the germinal epithelium (Fig. 6a), in which most of the spermatogenic cysts break releasing the spermatozoa to the testicular lumen. In the beginning of this phase, it is still possible to visualize cysts of spermatocytes and spermatids, however, with its progression, a reduced number of spermatid cysts are observed and the volume of spermatozoa in the lumen is too evidenced (Fig. 6a-b). Melanomacrophagic centers start to be observed in some regions of the testes (Fig. 6c).

Regression

The Regression phases appear post-reproduction. It could be identified by testes flaccidity, its length reduction, a totally discontinuous epithelium and by the presence of residual spermatozoa. Single Sertoli cells and melanomacrophagic centers are observed. The intertubular compartment (interstitium) occupies at this moment a large area of the testis, and the. As the Regression progresses, the residual spermatozoa are phagocytosed and the stem spermatogonia start the proliferation preparing the animal to a new reproductive cycle (Figs. 6d).

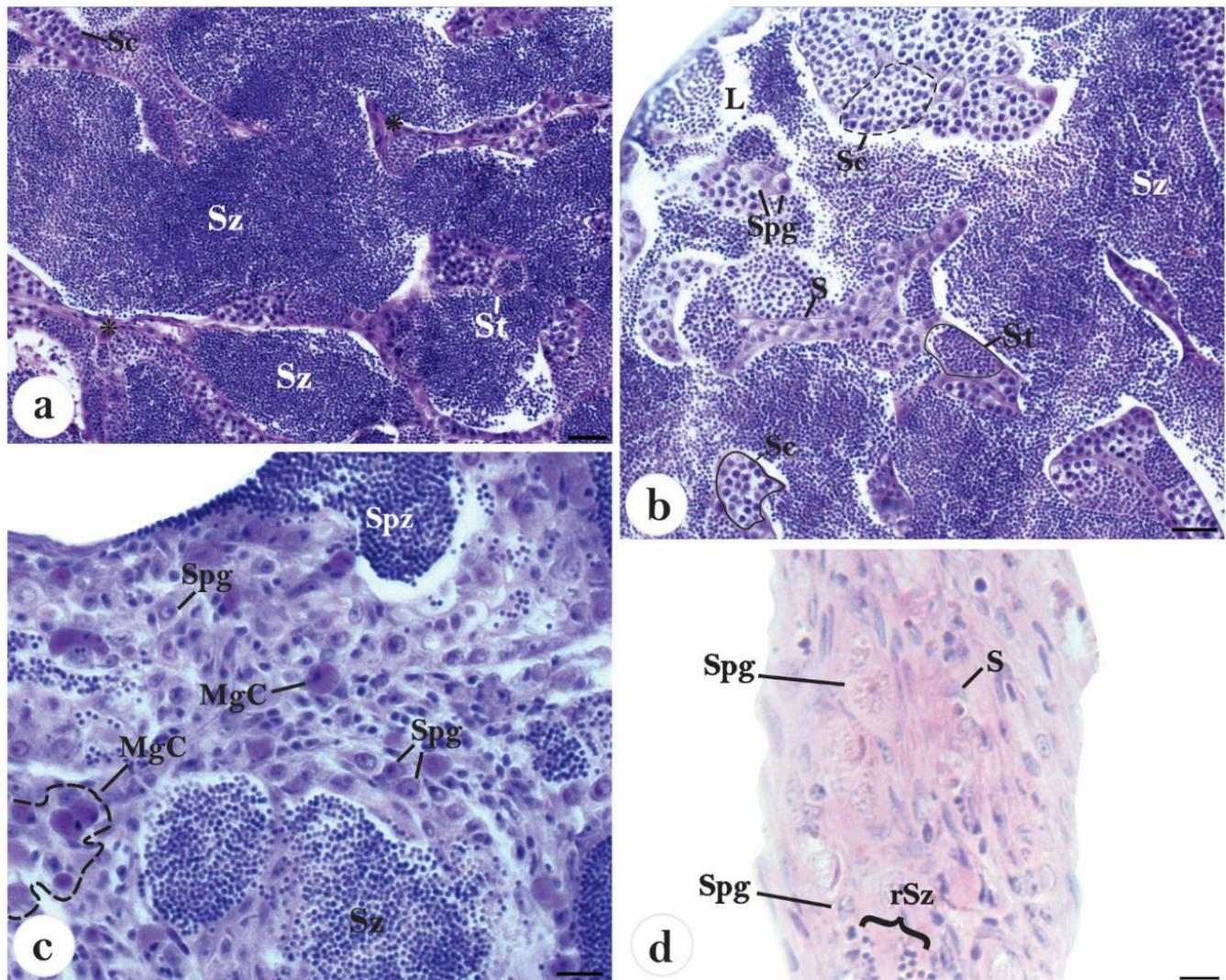


Figure 6. Spermatogenesis in *A. bimaculatus*. Final maturation: (a, b) Lumen (*L*) filled with spermatozoa (*Sz*) and discontinuous germinating epithelium (*) with some spermatocytes (*Sc*) and spermatids (*St*) cysts. Transition from final maturation to regression (c) with predominance of spermatozoa and in some regions melanomacrophagic centers (*MgC*). Regression: Residual spermatozoa (*rSz*) and spermatogonia (*SpG*) along the gonad. **Scale bar:** a, b, c: 25 μm ; d: 50 μm . **Color:** Hematoxylin and eosin.

Males were categorized according to their maturation status and subdivided throughout the seasons. The final maturation peak was found in the summer period and the other stages of maturation were found throughout the year (Fig. 7).

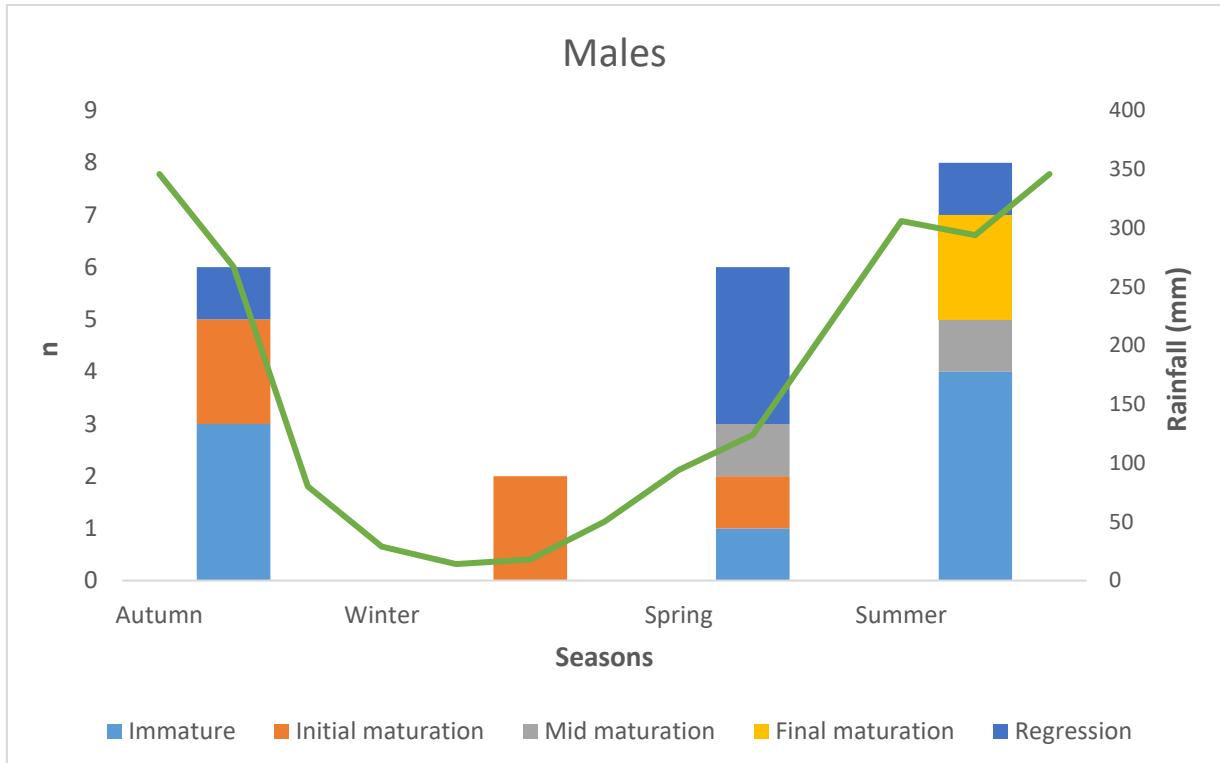


Figure 7. Gonadal development in males of *Astyanax bimaculatus* per season throughout of the year. Pluviometry data obtained from Climate-Data.org.

Discussion

Differently from previous studies in other populations of the tetra *A. bimaculatus*, in which the number of females was always bigger than males (Santos *et al.*, 1991; Barreto *et al.*, 1998), in this study the ratio between the genres was statistically proportional. Moreover, the reproductive strategy of the species was different from the population studied by Barreto and colleagues (1998) in Rio Grande basin in São Paulo State, since in the present study *A. bimaculatus* was spawning capable in more than a single time along the year. Once it is considered a “piracema” species, (Agostinho *et al.*, 2003), which means that its reproduction occurs only once in the hottest and in the major rainfall period of the year (summer season), these results are very innovative, showing the high adaptability of this species in the Amazonian streams.

Its reproductive plasticity is quite evidenced by the presence of Spawning Capable females in the Winter period, specifically in the end of September, when the rainfall index increased after the three months with the lowest register of that parameter in the year. As the temperatures in this region are constantly high during the year, the rain increases may act as a reproductive trigger, making the species spawn (Winemiller, 1989; Bailly *et al.*, 2008). That capacity is probably related to the asynchronous development of the oocytes of that species,

already reported by Agostinho and colleagues (2003), which can allow a major reproductive flexibility, enabling its reproduction as soon as the environmental conditions became favorable.

That scenario can help to explain the fact that only two maturation phases were observed in all females collected during the sampling period, hypothesizing that *A. bimaculatus* females are always prepared to the reproduction, depending only from an environmental trigger. Such a kind of behavior was already observed in other species, such as the sardines *Lycenaraulis grossiden* and *Plantanichthys platana* (Lopes *et al.*, 2018), which demonstrated to be able to adjust their reproduction based in the environmental conditions, being able to reproduce in any season of the. Nevertheless, differently from our finds, for those species reproduction are mainly triggered by the temperature.

The traditional reproductive index used to define the maturation phases in fish, the GSI, is sometimes considered unable to demonstrate the real reproductive status in some species. Because of this, Brown-Peterson and colleagues (2011) developed a great work, in which one of the objectives was to facilitate the definition of the reproductive status using the association between the macro (GSI) and microscopic aspects (histology), and for *A. bimaculatus*, the GSI was very condescending to the histological analyses of the gonads, indicating the same period of reproduction. Thus, besides Brown-Peterson *et al.* (2011), here, as already stated by Barbieri in 1982, we reinforce the importance of the GSI as an excellence reproductive indicator.

As the GSI, the Hepatosomatic index can be very important to understand the energetic spends and nutrition of a species during its reproductive cycle. In most of the species, the HIS is very reduced during the period of reproduction (Querol *et al.*, 2002; Zin *et al.*, 2011). According to Lampert *et al.* (2004), food consume is very intense in non reproductive periods. That strategy aim the conversion of the obtained energy in gonadal increase, and also as a nutritional storage for some reproductive strategies, as in species showing parental care, such the peacock bass (Kelber, 1999), in which the parental do not feed while are taking care of the offspring. However, differently, *A. bimaculatus* showed a different strategy with a bigger nutrition during the reproductive periods. That must be linked to increase of the availability of food at the same time rain increases, and the scarcity of food during the other periods.

At least the structural characteristics of *A. bimaculatus* are adequate to those other species of the same Family that live in Neotropical region (Siqueira-Silva *et al.*, 2018). Their testes are of the anastomosing tubular type and unrestricted spermatogonia corroborating Parenti and Grier (2004) hypothesis, which describes that the most primitive fish in the phylogenetic scale presents that testicular morphology (Parenti & Grier, 2004).

The present study showed that a fish species can adopt different strategies of reproduction, being totally dependent of the habitat and, consequently, the abiotic factors that interferes in the studied region. Those results emphasize the need for knowledge not only in the basic aspects in biology of reproduction, but crosslinking that characteristics to the surrounding habitat.

Acknowledgments

The Zoobotanical Foundation of Marabá, where the collections were held. To the Laboratory of Biotechnology / CEPTA - Pirassununga - SP, and to the Reproductive and Molecular Biology Group - Institute of Biosciences of Botucatu (IBB - UNESP) for allowing the accomplishment of histological procedures. To the Laboratory of Neuroscience and Behavior Frederico Graef - LaNeC and to the Group of Studies and reproduction of Amazonian Fish - GERPA, for the support and structure. Finally, the Federal University of South and Southeast of Pará - Unifesspa for the structure.

Referências

- Agostinho, A. A., Gomes, L. C., Suzuki, H. I. & Júlio-Junior, H. F. (2003). Migratory fishes of the upper Paraná River basin, Brazil. In *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*, Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (eds). *World Bank and IDRC*: Victoria; 19–99.
- Andrian, I. F., Silva, H. B. R. & Peretti, D. (2001). Dieta de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae), da área de influência do reservatório de Corumbá, Estado de Goiás, Brasil. *Acta Sci.* **23**, 435 - 440.
- Barbieri, G., Santos, M. V. R. & Santos, J. M. (1982). Época de reprodução e relação peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (pisces, characidae). *Pesq. Agropec. Bras.* **17**, 1057 - 1065.
- Barbosa, N. D., Rocha, R. M. & Lucena Frédou, F. (2012). The reproductive biology of *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) in the Pará River estuary (Amazon Estuary). *J Appl Ichthyol* **28**, 800 – 805.

- Barreto, B. P., Ratton, T. F., Ricardo, M. C. P., Alves, C. B. M., Vono, V., Vieira, F., Rizzo, E. & Bazzoli, N. (1998). Biologia reprodutiva do lambari *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) no rio do Carmo, bacia do rio Grande, São Paulo. *BIOS, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas* **6**, 121 – 130.
- Bailly, D., Agostinho, A. A. & Suzuki, H. I. (2008). Influence of the flood regime on the reproduction of fish species with different reproductive strategies in the Cuiabá river, upper Pantanal, Brazil. *River. Res. Applic.* **24**, 1218 – 1229.
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D., Saborido-Rey, M. F., Macewicz, B. J. & Lowerre-Barbieri, S. K. (2011). A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Mar Coast Fish* **3**, 52-70.
- Cassel, M., Chehade, C., Branco, G. S., Caneppele, D., Romagosa, E. & Borella, M. I. (2017). Ovarian development and the reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over one year: Applications in fish farming. *Theriogenology* **98**, 1 – 15.
- Chagas, J. M. A., Ninhau-Silveira, A. & Veríssimo-Silveira, R. (2016). Ciclo testicular de *Devario aequipinnatus* (Teleostei, Cyprinidae): Um potencial modelo biológico em experimentação animal. *Bol. Inst. Pesca* **42**, 765 – 779.
- Climate-Data.org. Clima Marabá. Available at: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/para/maraba-715120/>. Accessed: 26 November 2018.
- De Jesus-Silva, L. M., Oliveira, P. V., Ribeiro, C. O., Ninhau-Silveira, A. & Veríssimo-Silveira, R. (2018). Ovarian cycle in *Devario aequipinnatus* with emphasis on oogenesis. *Zygote* **26**, 168 – 176.
- Felizardo, V. O., Murgas, L. D. S., Andrade, E. S., López, P. A., Freitas, R. T. F. & Ferreira, M. R. (2011). Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Theriogenology* **77**, 1570 – 1574.
- Godinho, A. L., Lamas, I. R. & Godinho, H. P. (2009). Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. *Environ Biol Fish* **87**, 143 – 162.

- Grier, H. J. & Taylor, R. G. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *J. Fish Biol.* **53**, 521 – 542.
- Kelber, D. Tucunaré uma paixão internacional. *São Paulo: Arte & Ciência*, 1999.
- Lampert, V., R., Azevedo, M. A. & Fialho, C. B. (2004). Reproductive biology of *Bryconamericus iheringii* (Ostariophysi: Characidae) from rio Vacacaí, RS, Brazil. *Neotrop Ichthyol* **2**, 209 – 215.
- Lopes, C. A., Reynalte-Tanaje, D. A. & Nuñer, A. P. O. (2018). Reproductive dynamics of *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes: Engraulidae) and *Platanichthys platana* (Clupeiformes: Clupeidae) in a subtropical coastal lagoon. *Braz. J. Biol.* **78**, 477 – 486.
- Marcon, L., Thomé, R. G., Mounteer, A. H., Bazzoli, N., Rizzo, E. & Benjamin, L. A. (2017). Immunohistochemical, morphological and histometrical analyses of follicular development in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) exposed to an organochlorine insecticide. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **143**, 249 – 258.
- Mendes, Y. A., Lee, J. T., Viana, I. K. S., Rocha, R. M. & Ferreira, M. A. P. (2018). Reproductive biology of the tiger pleco *Panaqolus tankei* (Loricariidae) in a lentic system of the Amazon Basin. *J. Fish Biol.* **93**, 711 – 714.
- Mereles, M. A., Piñeyro, J. I. G., Marshall, B. G. & Sousa, R. G. C. (2017). Impacts of fish farm dams on temporal and spatial distribution of *Astyanax* cf. *bimaculatus* in microbasins of Machado River (Rondônia, Brazil). *Biota Amazônia* **7**, 4 – 7.
- Normando, F. T., Santiago, K. B., Gomes, M. V. T., Rizzo, E. & Bazzoli, N. (2013). Impact of the Três Marias dam on the reproduction of the forage fish *astyanax bimaculatus* and *A. fasciatus* from the São Francisco River, downstream from the dam, southeastern Brazil. *Environ. Biol. Fish.* **97**, 309 – 319.
- Parenti, L. R. & Grier, H. J. (2004). Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes. *Integrative and Comparative Biology* **41**, 333 – 348.

Prudente, B. S., Ferreira, M. A. P., Rocha, R. M. & Montag, L. F. A. (2014). Reproductive biology of the piranha *Serrasalmus gouldingi* (Fink and Machado-Allison 1992) (Characiformes: Serrasalmidae) in “drowned” rivers of the Eastern Amazon. *Environ. Biol. Fish.* **98**, 11 – 22.

Querol, M. V. M., Querol, E. & Gomes, N. N. A. (2002). Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (OSTEICHTHYES, LORICARIIDAE), Bacia do rio Uruguai médio, sul do Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.* **92**, 79 – 84.

Rezende, F. P., Filho, O. P. R., Pereira, M. M., Takabatake, É. Y., Navarro, R. D., Santos, L. C., Silva, R. F. & Filho, C. B. C. (2005). Eficiência de Diferentes Substratos na Desova de Lambari Tambiú (*Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758). *Rev. Ceres* **52**, 527 – 533.

Rodrigues, M. S., Siqueira-Silva, D. H., Quirino, P. P., Ninhaus-Silveira, A. & Veríssimo-Silveira, R. (2015). Spermatogenesis in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: a histological analyses with emphasis to spermatogonial and spermatid types*. *Bol. Inst. Pesca* **41**, 697 – 705.

Santos, R. A., Campos, E. C., Camara, J. J. C. & Mandelli junior, J. (1991). Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), na represa de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil. *Bol. Inst. Pesca* **18**, 1 – 11.

Santos, D. C. M., Cupertino, M. C., Matta, S. L. P., Oliveira, J. A. & Santos, J. A. D. (2015). Histological alterations in liver and testis of *Astyanax* aff. *bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. *Rev. Ceres* **62**, 133 – 141.

Siqueira-Silva, D. H., Vicentini, C. A., Ninhaus-Silveira, A. & Veríssimo-Silveira, R. (2013). Reproductive cycle of the Neotropical cichlid yellow peacock bass *Cichla kelberi*: A novel pattern of testicular development. *Neotrop ichthyol* **11**, 587 – 596.

Siqueira-Silva, D.H., da Silva Rodrigues, M. & Nóbrega, R.H. (2018) Testis structure, spermatogonial niche and Sertoli cell efficiency in Neotropical fish. *General and Comparative Endocrinology* **103**, 149 – 142.

Vazzoler, A. E. (1996). Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. São Paulo: EDUEM - Editora da Universidade Estadual de Maringá, **1**, 146 pp.

Vilela, C. & Hayashi, C. (2001). Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. *Acta Sci. 23*, 491 – 496.

Weber, A. A., Arantes, F. P., Sato, Y., Rizzo, E. & Bazzoli, N. (2012). Oocyte adhesiveness and embryonic development of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae). *Zygote* **21**, 198 – 202.

Winemiller, K. O. (1989). Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia* **81**, 225 – 241.

Zin, T., Than, A. A. & Naing, T. T. (2011). Fecundity (F), gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI), condition factor (K) and length-weight relationship (LWR) in *Channa orientalis* Bloch & Schneider, 1801. *Universities Research Journal* **4**, 47 – 62.

Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. (2018). Species by Family/subfamily. Available at: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Accessed: 11 November 2018.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os testículos dos espécimes de *A. bimaculatus* foram caracterizados como do tipo tubular anastomosado com distribuição irrestrita das espermatogônias.
- As fêmeas possuem desenvolvimento oocitário assincrônico.
- A espécie apresentou dois picos reprodutivos: no final do inverno e no verão.
- Com base no trabalho realizado, percebe-se a importância do desenvolvimento de estudos relacionados a biologia reprodutiva das espécies regionais, tendo em vista as características ambientais peculiares, tais como a flutuação do regime hídrico.
- Outros estudos com as demais espécies da região são necessários para uma melhor compreensão e conservação dos Rios e riachos da Floresta Amazônica.

ANEXO A – Página do periódico de submissão do manuscrito.

The screenshot shows the Cambridge Core website for the journal *Zygote*. At the top, there's a navigation bar with links for Academic, Cambridge English, Education, Books, Digital Products, About Us, and Careers. The main header for the journal is "Zygote: The Biology of Gametes and Early Embryos". Below the header is a search bar labeled "Search Zygote content" with a magnifying glass icon. There are also buttons for "Submit your article" and "Information". The main content area features a large image of a zygote under a microscope. Below this, there's a summary of the journal's scope, its impact factor (1.114), and a section for "Most read" articles. The URL shown in the address bar is <https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/information/instructions-contributors>.

Instruções de submissão:

<https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/information/instructions-contributors>