

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Biologia reprodutiva de surubins do Iguaçu,
Steindachneridion melanodermatum, em
condições de cativeiro**

Lucelia Tessaro

Jaboticabal, São Paulo
2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Biologia reprodutiva de surubins do Iguaçu,
Steindachneridion melanodermatum, em
condições de cativeiro**

Lucelia Tessaro
Bióloga

**Orientadora: Dra. Irani Quagio Grassiotto
Co-orientador: Dr. Robie Allan Bombardelli**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da Unesp, CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora

Jaboticabal, São Paulo

2015

T338b Tessaro, Lucelia
Biologia reprodutiva de surubins do Iguaçu, *Steindachneridion melanodermatum*, em condições de cativeiro / Lucelia Tessaro. -- Jaboticabal, 2015
ix, 77p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp, 2015
Orientadora: Irani Quagio Grassiotto
Co-orientador: Robie Allan Bombardelli
Banca examinadora: Evoy Zaniboni Filho, Hugo Pereira Godinho, Laura Satiko Okada Nakagui, Sergio Ricardo Batfouni
Bibliografia

1. Reprodução. 2. Histologia. 3. Peixes. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura

CDU 639.3.03

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

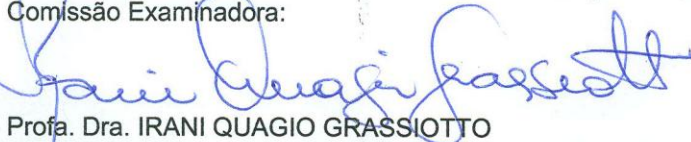
TÍTULO: Biologia Reprodutiva do Surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) em condições de cativeiro

AUTORA: LUCELIA TESSARO

ORIENTADORA: Profa. Dra. IRANI QUAGIO GRASSIOTTO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBIE ALLAN BOMBARDELLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. IRANI QUAGIO GRASSIOTTO

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu



Prof. Dr. EVOY ZANIBONI FILHO

Departamento de Aquicultura / Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. HUGO PEREIRA GODINHO

Academia Brasileira de Medicina Veterinária, Belo Horizonte-MG



Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI

Laboratório de Reprodução de Peixes / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"



Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 16 de junho de 2015.

Sumário

Resumo	10
Abstract	11
Introdução	13
Material e métodos	17
Amostragem	17
Biometria e Coleta	18
Avaliação histológica	19
Análise de esteróides	20
Histomorfometria	20
Coleta e análise de sêmen	21
Avaliação em microscopia eletrônica	22
Análise de dados	22
Resultados	23
Machos	24
Parâmetros biométricos	24
Análise de esteroides	26
Evolução das células germinativas	27
Ciclo reprodutivo	31
Análise de sêmen	36
Machos imaturos e primeira onda espermática	39
Fêmeas	42
Parâmetros biométricos	42
Análise de esteroides	45
Desenvolvimento ovariano	46
Histomorfometria	48
Eventos isolados	53
Gônadas com desenvolvimento irregular	53
Ocorrência de ovócitos vitelogênicos	54
Indivíduo em intersexo	55
Discussão	56
Considerações finais	66
Conclusão	67
Referências Bibliográficas	68

Dedicatória

Aos meus pais

Nicanor Tessaro e Irene Duffeck Tessaro

Que sempre me apoiaram em tudo o que desejei fazer, e

Arthur Leonardo Scherer Bottini

Pelo incentivo, paciência, atenção e carinho
que me dedicou ao longo desses anos

Agradecimentos

Ao Programa de Pós graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (CAUNESP);

Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu;

Ao Instituto de Pesquisas em Aquicultura Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (InPAA-Unioeste), pela estrutura de campo e apoio logístico;

À Companhia paranaense de energia elétrica (COPEL) pela doação dos peixes e pelo acesso a estação experimental de estudos ictiológicos, em especial a Eder Felipe Morschbacher que intermediou e facilitou estes processos;

À Tractebel energia pelo auxílio na manutenção dos animais;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME), da Universidade Estadual Paulista de Botucatu, pela ajuda no processamento das amostras;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelos meses de bolsa de estudo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos (processo no 2012/01824-4) e apoio financeiro do projeto (2013/05892-7), e especialmente pelas avaliações dos pareceristas da agência, cujas correções e sugestões enriqueceram o trabalho;

Ao assistente da Pós graduação, David Oliveira Lorente, pela eficiência e paciência;

À minha orientadora, Dra. Irani Quagio Grassiotto, por seu exemplo de ética e profissionalismo. Além disto, agradeço por me receber como sua aluna, pela confiança que depositou e por toda a liberdade que me concedeu;

Ao meu co-orientador Dr. Robie Allan Bombardelli, pela estrutura, pela manutenção dos peixes e pelo apoio (logístico e pessoal) de sempre;

A Arno Juliano Butze e Adriano Luiz Heinen, que me acompanharam desde o início e por tantas vezes doaram seu tempo, suas experiências e atenção a este experimento. Além disto, serem agradáveis companhias e sempre dividirem o chocolate;

A Marcos Granville e Giovano Neumann pela grande ajuda nas coletas;

A todo o pessoal do Ltraac (Laboratório de tecnologia da reprodução de animais aquáticos cultiváveis- Unioeste, Toledo-PR), por nunca me deixar sem auxílio;

À professora Dra. Eunice Oba, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ), e à professora Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton, do Instituto de Biociências de São Paulo (IB-USP), pelo tempo que dedicaram a me instruir e auxiliar com as análises de esteroides;

A Renato Honji e Gabriela Brambilla pelo auxílio com as dosagens de estradiol;

A Talita Sarah Mazzoni pela ajuda com as técnicas, especialmente as de imunohistoquímica e, sobretudo, por abrir as portas do laboratório e da sua casa para me receber;

A Keila Emilio e Julio Santana pela ajuda com os cortes, normais e semi-finos, pela companhia e discussões filosóficas no laboratório;

À professora Daniela Carvalho dos Santos, por me receber como estagiária em suas turmas;

A Rinaldo José Ortiz por me ensinar a usar o microscópio eletrônico, pela ajuda com as fotos, pelas caronas e, principalmente, pela companhia e paciência. E também pelos chás de hortelã e tantas latas de coca-cola compartilhadas;

A Cleozita e Sabrina Ortiz, por me “emprestarem” o Rinaldo e me acolherem tão bem em sua casa e em sua família;

A Daniel Dantas Wildner pela ajuda com as lâminas, pelas muitas caronas e especialmente pela companhia, pelas inúmeras conversas e muitos conselhos;

A Marcelo Armelin (Lelo) por me ajudar com a mudança, por me receber tantas vezes em sua casa e mais que tudo, me acolher neste tempo de convivência em Botucatu;

A Clarianna Martins Baicere Silva que tornou o pouco tempo que compartilhamos em simpatia, alegria e solidariedade;

A Letícia Hayashi Higushi que abriu tantas vezes as portas das suas casas para me abrigar, em Jaboticabal. E a Adriana Bordignon, Cleonice Hilbig e Maria Paes por permitir que a Letícia fizesse isso;

Às meninas da “República Kataia” (Fernanda Yamamoto; Karina Alves, Ayesha Ribeiro Pedrozo e Gel Albuquerque) que me alojaram, mesmo sem me conhecer. Por serem solidárias e prestativas. Agradecimento especial para Karina (Nuros) e Ayesha (Briófita) pela atenção, simpatia e companhia para ver televisão;

A Alis Bitarello por estar sempre por perto (me fazer companhia nos filmes e me emprestar seus livros e, principalmente, seus ouvidos);

À família Bottini (Edgar, Eunice e Thiago) pela simpatia e atenção que me dedicam, e pelo abrigo em todos estes meses de coleta;

À minha família, especialmente às irmãs (Angela e Mari), irmão (Ricardo) e cunhada (Stephanny Vaz) que sempre me alegraram; e ao sobrinho (Arthur Henrique) que trouxe mais luz e felicidade para este mundo;

A todos que contribuíram de alguma maneira, muito obrigada.

Apoio financeiro

Este trabalho contou com o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio de bolsa de estudos (2012/01824-4) e processo de auxílio à pesquisa (2013/05892-7).

Resumo

Entender a dinâmica e os eventos reprodutivos de cada espécie é essencial para o controle e melhoria da reprodução em cativeiro. O surubim do Iguaçu faz parte um programa de repovoamento do rio Iguaçu e suas proles provêm de reprodução induzida, porém aspectos básicos de sua biologia reprodutiva, como idade em que acontece o primeiro ciclo de reprodução e os meses que representam o período reprodutivo, são desconhecidos ou pouco explorados. O trabalho foi conduzido a fim de levantar informações a respeito do desenvolvimento reprodutivo da espécie, em uma população de cativeiro. Foram utilizados peixes juvenis (n≈154), machos e fêmeas, a partir de um ano de idade que foram acompanhados, mensalmente, durante 24 e 36 meses, respectivamente. Foram avaliados parâmetros referentes ao desenvolvimento gonadal, alterações celulares e flutuação de esteroides sexuais (estradiol e testosterona) ao longo do tempo. Nas condições do experimento, os animais apresentaram crescimento corporal e ganho de peso gradual. Fêmeas apresentaram desenvolvimento sexual tardio e permaneceram imaturas até 48 meses (4 anos de idade). Observou-se o desenvolvimento celular e alteração nos níveis de esteroides, que acompanharam os picos verificados para os machos. Os machos apresentaram ciclo reprodutivo do primeiro para o segundo ano de vida e todas as fases reprodutivas foram observadas. O padrão de desenvolvimento gonadal, aliado às modificações celulares e flutuação de esteroides indica o período reprodutivo dos machos nos meses de setembro a novembro (primavera).

Palavras- chave: espermatozoide, esteroides plasmáticos, morfologia de gônadas, morfometria de ovócitos

Abstract

Understand events and reproductive dynamics is essential for the appropriate management and control of reproductive function in captivity. The species, “surubim do Iguçu” is include in Iguçu river reintroduction programs and offspring’s were obtain by induce spawning, but reproductive biology aspects, as first maturation age and reproductive season are lower explored or no available. The research was realized to provide information about surubim’s reproductive development, in captive conditions. Were evaluated juvenile individuals, with one year old, every month due 24 and 36 months, to male and female, respectively. Were evaluated gonad developments, cell modifications and steroids fluctuations (estradiol and testosterone), during all experimental time. The fish showed gradative growth and weight gain. Female present slow sexual development and stay in immature status after 48 months (4 years age). Cellular modifications and steroids elevation levels were verified, and peaked of steroids occur in same time of male peaked. Male showed reproductive cycle with two years old and all reproductive phases of were observed. The gonadal development with to cellular changes and steroids fluctuation indicates the breeding season the males in the months from September to November (spring).

Key- Words: spermatozoa, plasma steroids, gonad morphology, oocyte morphometry

A apresentação das referências
bibliográficas foi formatada segundo as
normas do periódico *Journal of Fish Biology*

Introdução

A reprodução é um processo complexo e a interação do animal com o ambiente resulta em alterações fisiológicas diversas (Kim *et al.*, 2006), cujas respostas determinam as estratégias reprodutivas e o sucesso da reprodução nas diferentes espécies.

Mediadas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada, os estímulos para a reprodução iniciam-se pela liberação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), pelo hipotálamo (Kim *et al.*, 2006), diretamente sobre a hipófise. Esta secreta uma série de hormônios que atuam como fatores-chave para a regulação da reprodução (Swason *et al.*, 2003).

O hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) são importantes gonadotropinas secretadas durante o ciclo reprodutivo (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Por transporte sanguíneo chegam às gônadas e em ambos os sexos desempenham dupla função: desenvolvimento de células germinativas e produção de esteroides (Hafez *et al.*, 2004).

Os esteroides são importantes agentes metabólicos que atuam sobre os mais diversos aspectos. Em humanos, tem sido relacionados à manutenção de cartilagens e ossos (Wolff *et al.*, 2012), ganho de massa muscular (Ignacio *et al.*, 2009) e até mesmo com mecanismos neurocognitivos ligados à memória (Colciago *et al.*, 2015). Nos peixes, sua influência é relatada sobre o crescimento (Cleveland e Weber, 2015) e sobre a reprodução (Munakata e Kobayashi, 2010).

Os andrógenos estão envolvidos com a proliferação celular e espermatogênese (Miura e Miura, 2003), início da puberdade e maturação espermática (Schulz *et al.*, 2010), além de atuarem sobre o comportamento reprodutivo (Munakata e Kobayashi, 2010) e sobre a regulação da via em nível de hipotálamo e hipófise (Schulz e Goss, 1999). Os estrógenos são relacionados a processos de proliferação celular (Schulz e Miura, 2002) e são especialmente citados no processo de ovogênese, no qual o estradiol circulante age no fígado estimulando a produção de vitelogenina, que é incorporada nos ovócitos em desenvolvimento (Tyler e Sumpter, 1996; Lubzens *et al.*, 2010).

As mudanças no perfil de esteroides sexuais ao longo do ciclo reprodutivo podem ser evidenciadas e utilizadas como indicadores de atividade reprodutiva, tanto para machos (Degani *et al.*, 1998; Barcellos *et al.*, 2002) quanto para as fêmeas de peixes (Barcellos *et al.*, 2001; Arantes *et al.*, 2010). Devido à integração dos processos fisiológicos envolvidos com a reprodução, a ação dos hormônios se reflete diretamente sobre o desenvolvimento das gônadas (Munakata e Kobayashi, 2010), que é dependente da modificação das células germinativas (Grier e LoNostro, 2000; Brown-Peterson *et al.*, 2002).

As alterações celulares refletem-se sob os aspectos morfológicos das gônadas, de maneira que estudos sobre a biologia reprodutiva em peixes de água doce são tradicionalmente realizados macroscopicamente e a observação de alterações de forma, de tamanho, de cor e de textura das gônadas são utilizadas como parâmetros para a classificação dos estágios de maturação dos reprodutores (Vazzoler, 1996; Andrade *et al.*, 2010). Ainda, a observação do epitélio germinativo permite a verificação dos estágios de desenvolvimento celular nos ovários e testículos, promovendo a caracterização de fases reprodutivas durante o ciclo reprodutivo dos peixes. Para fins de classificação, e com base nas modificações no epitélio germinativo, os animais são distribuídos em cinco fases: imaturos, em desenvolvimento, aptos a liberar gametas, em regressão e em regeneração (Brown-Peterson *et al.*, 2011). Escala suficientemente flexível para ser utilizada nas espécies neotropicais (Wildner *et al.*, 2013).

Outras ferramentas de análise podem ser importantes para entender a dinâmica reprodutiva nas diferentes espécies. A histomorfometria é usada para estudos em mamíferos e avaliações relacionadas à reprodução incluem a quantificação do diâmetro dos túbulos seminíferos (Pereira *et al.*, 2012; Morais *et al.*, 2013) e altura do epitélio testicular (Babei *et al.*, 2012). Em peixes, as aplicações estão relacionadas à quantificação de tipos celulares nos machos (Alvarenga e França, 2009) e à medição do diâmetro dos ovócitos nas fêmeas, realizada em amostras obtidas por biópsias ou extrusão mecânica (Romagosa *et al.*, 2001). Já a descrição de células em microscopia eletrônica permite a compreensão de eventos de formação de folículos ovarianos (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011) e características dos ovócitos (Brasil, 2001; Romagosa *et al.*, 2001),

evolução e diferenciação de células germinativas masculinas (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003; Batlouni *et al.*, 2006), caracterização e classificação de células espermáticas (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2005), bem como avaliação de qualidade de espermatozoides (Viveiros *et al.*, 2011) e evidências dos eventos de fecundação (Brasil *et al.*, 2002).

Independente dos métodos utilizados para avaliação, as características reprodutivas são importantes aspectos a serem considerados quando o objetivo é a manutenção de espécies fora de seu ambiente de origem. Nas condições de cativeiro o processo de reprodução natural, muitas vezes, não se completa (Mylonas *et al.*, 2010) e disfunções reprodutivas são relatadas para machos e fêmeas (revisão em Zohar e Mylonas, 2001), o que tornam relevantes os estudos relacionados à dinâmica reprodutiva das espécies de peixes.

O animal em estudo é o surubim do Iguaçu. Esta espécie foi descrita pela primeira vez como *Steindachneridion* sp (Garavello, 1991 *apud* Sereia, 2010) e é uma espécie endêmica do rio Iguaçu. Na revisão do gênero, que aconteceu em 2005, essa foi descrita como *Steindachneridion melanodermatum* por Garavello (2005). A espécie foi caracterizada como migradora de longa distância (Suzuki *et al.*, 2003), mas devido aos represamentos sua distribuição está restrita aos trechos entre usinas hidrelétricas ao longo do rio Iguaçu (Garavello, 2005).

A taxa de captura desta espécie é baixa (Daga e Gubiani, 2012), sendo que está incluída no programa de repovoamento do rio Iguaçu desde 1996 (Ludwig *et al.*, 2005). As reproduções neste programa acontecem entre os meses de novembro a fevereiro (meses mais quentes), sugerindo pico reprodutivo desta espécie neste período. Contudo, sem outras informações, os animais utilizados para a reprodução são selecionados em virtude do comprimento e do peso, sendo amostrados aqueles peixes maiores que 30cm, de comprimento padrão, e com peso superior a 1kg (Ludwig *et al.*, 2005).

Estudos relacionados à espécie dizem respeito ao desenvolvimento inicial de larvas (Sant'anna, 2009; Sereia, 2010) e caracterização seminal (Sant'anna, 2009; Marcos, 2012). A espécie também tem sido alvo de estudos que visam sua exploração comercial, devido ao seu porte e por apresentar resultados positivos

em cultivos experimentais (Feiden *et al.*, 2006; Bittencourt *et al.*, 2009; Sary, 2014).

Apesar de a reprodução artificial do surubim do Iguaçu ocorrer de maneira relativamente satisfatória (Ludwig *et al.*, 2005), a idade de primeira maturação, a dinâmica do desenvolvimento gonadal e as variações que correspondem ao ciclo reprodutivo da espécie não foram exploradas. Características que poderiam contribuir para o manejo adequado dos reprodutores e otimizar o processo de produção de ovos e larvas.

Levando em consideração os diversos aspectos que envolvem os eventos reprodutivos, o objetivo do trabalho foi acompanhar o desenvolvimento de uma população de juvenis de surubim do Iguaçu, em condições de cativeiro, através da análise mensal de parâmetros reprodutivos.

Para tal, modificações macroscópicas das gônadas, descrição das características e alterações morfológicas nas células germinativas e a quantificação de esteroides plasmáticos, em machos e fêmeas, foram avaliadas a fim de verificar a ocorrência de ciclo reprodutivo e indicar o período (meses) em que os animais estão preparados para responder de maneira mais eficiente aos estímulos para a reprodução, natural e/ou artificial. Além disso, com vistas à caracterização seminal, procedeu-se à análise estrutural e ultra-estrutural dos gametas masculinos.

Material e métodos

Amostragem

Os animais utilizados no estudo foram provenientes de reprodução artificial e obtidos por meio de doação da Estação Experimental de Estudos Ictiológicos da Companhia Paranaense de Energia Elétrica (EEEI- COPEL), pelo programa de repovoamento do rio Iguaçu.

Os peixes foram transferidos, com seis meses de idade, para o Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em Toledo-PR, onde foram alojados em um tanque único com área útil de 200m², numa densidade inicial de 1,5 peixes por m² de área (300 animais) que foi sendo gradativamente reduzida pela retirada mensal dos peixes.

Os peixes, quando estocados, estavam condicionados a ingerir alimento inerte (ração) e foram alimentados diariamente, duas vezes ao dia, com ração comercial contendo 32% de proteína bruta.

As coletas tiveram início quando os animais completaram um ano de idade (12 meses). Neste período apresentaram peso médio inicial de 83,70±3,5g e comprimento padrão médio inicial de 18,20±0,32 cm.

O tanque foi abastecido com água do rio São Francisco Falso, sob condições naturais de fotoperíodo e temperatura. A entrada de água foi constante, para melhorar a oxigenação, e mantida em baixo fluxo para não promover alterações bruscas de temperatura.

Segundo dados do Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA), as temperaturas superficiais dos tanques de cultivo, durante o período experimental, variaram em média de 14 e 22° C para os meses de outono, de 13 a 22° C para os meses de inverno, de 16 a 30° C para os meses de primavera e entre 25 e 31° C para os meses de verão.

Durante o período, não foram promovidas alterações nas condições do tanque (tais como adubação, manejo ou inserção de outros peixes) e a

manipulação dos animais acontecia apenas em virtude das coletas. A limpeza do fundo, para a retirada do excesso de lodo e calagem, foi realizada ao fim de cada ano.

De janeiro de 2012 até dezembro de 2013, pelo menos 4 machos e 4 fêmeas, selecionados aleatoriamente, foram mensalmente capturados do tanque de cultivo com auxílio de redes de arrasto e transportados, em baldes com água, ao laboratório para a realização dos procedimentos experimentais.

Na tentativa de obter mais informações, a coleta de amostras das fêmeas foi estendida por mais doze meses, até dezembro de 2014.

Coletas extras de machos com 4, 8 e 11 meses foram realizadas. Estes animais foram coletados nos tanques de cultivo da Estação Experimental de Estudos Ictiológicos da Companhia Paranaense de Energia Elétrica (EEEI-COPEL) localizados em Reserva do Iguaçu, PR. Como a distinção entre machos e fêmeas não era possível, foram selecionados animais ao acaso, sendo capturados 13, 10 e 7 animais, respectivamente. Somente na última captura, dos animais com 11 meses de idade, a distinção macroscópica das gônadas, masculinas e femininas, foi possível.

Biometria e Coleta

Para a realização dos procedimentos, os peixes foram submetidos à anestesia por imersão em benzocaína a 75mg/mL (Fagundes, 2009). Após a anestesia foram obtidos os parâmetros biométricos, realizada a coleta de sangue e posterior eutanásia.

A biometria consistiu na pesagem individual dos peixes, em balança digital, e na medição do comprimento padrão dos animais, (entende-se comprimento padrão como a distância entre a parte anterior da cabeça e o final da coluna vertebral (Vazzoler, 1996).

Para a coleta de sangue foram utilizadas seringas heparinizadas. As amostras de sangue foram centrifugadas por 20 minutos em 3200 rotações por

minuto ou força centrífuga relativa de 2060 x g, para a obtenção do plasma (aproximadamente 0,5mL) que foi estocado a -20°C, para posterior avaliação dos esteroides (adaptado de Barcellos *et al.*, 2002). Na sequência, foi realizada eutanásia por meio de deslocamento cervical (CFMV, 2008) e os peixes foram dissecados para retirada das gônadas (protocolo CEUA N° 375, de 19/12/2011).

As gônadas foram utilizadas para a caracterização macroscópica das fases reprodutivas e pesadas em balança digital, para a obtenção do índice gonadossomático (IGS) (Vazzoler, 1996). Após a pesagem, os órgãos foram fixados em solução de Karnovsky, para o preparo das lâminas histológicas.

Avaliação histológica

Todas as amostras de testículos e ovários foram preparadas para avaliação histológica. Para tal, as amostras fixadas em solução de Karnovsky (paraformol 8% + glutaraldeído 25% + tampão fosfato de Sorensen com ph 7,4), desidratadas, em série crescente de etanol, infiltradas e incluídas em resina histológica.

Foram obtidos cortes transversais com 3µm de espessura, corados com azul de toluidina, para observação geral das estruturas (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011) e PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow para evidenciar áreas ricas em polissacarídeos neutros (Quintero-Hunter *et al.*, 1991). Nas lâminas, foram verificadas as modificações do epitélio germinativo, segundo Brown- Peterson e colaboradores (2011).

Ainda, algumas amostras foram submetidas à técnica de reticulina, cuja marcação indica a presença de fibras colágenas (ou reticulares), que é um dos componentes da membrana basal (Puchtler e Waldrop, 1978), elemento que delimita o epitélio germinativo (Tracker e Grier, 2005).

Análise de esteróides

A dosagem de testosterona total foi realizada nas amostras de plasma por meio de radioimunoensaio (RIA), utilizando kits comerciais (Beckman Coulter.[®] Immunotech). O processamento e a leitura das amostras foram realizados no Laboratório de Endocrinologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. O preparo das amostras, curvas de calibração e tempo de leitura de radiação gama foram conduzidas conforme recomendação do fabricante.

Para a dosagem de estradiol (17 β -estradiol), foi utilizado o método de imunoensaio enzimático (ELISA). As análises se deram pelo uso de kits comerciais, segundo a recomendação do fabricante (IBL[®]International) e foram realizados no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), São Paulo-SP.

Histomorfometria

Para as fêmeas, foram realizadas avaliações morfométricas nos ovócitos, das quais foram obtidos valores de área e perímetro dos folículos ovarianos, utilizando o programa *Image Pro-plus*[®].

As avaliações foram realizadas utilizando imagens (obtidas em microscópio com aumento de 40x) e foram analisadas entre 100 e 200 células em cada fêmea. Foram utilizados apenas os folículos em que o plano de corte permitia a clara visualização do núcleo celular. Não foram utilizadas ovogônias ou ovócitos iniciais localizados nos ninhos.

A média individual de cada fêmea foi considerada uma repetição e foi utilizada para gerar uma média mensal, submetidas às análises posteriores. Ainda valores mínimos e máximos da área e perímetro, obtidos em cada indivíduo, foram selecionados e usados para gerar a média mensal de tais valores, a fim de ilustrar a variação de desenvolvimento dos folículos em crescimento primário.

Coleta e análise de sêmen

Machos, com cerca de dois anos de idade, foram avaliados mensalmente em relação à liberação de sêmen e parâmetros seminais. Para isto, cinco machos foram selecionados ao acaso, identificados individualmente e submetidos a protocolo de manipulação reprodutiva.

A marcação dos animais foi feita, sob anestesia, pela inserção subcutânea de uma cápsula contendo micro circuito eletrônico (Animall-Tag[®]). Para a manipulação reprodutiva fez-se o uso de extrato pituitário de carpa (EPC) (Woyrnarovich e Horvath, 1983), aplicado de forma intramuscular na região dorsal, em dose única contendo 3,0 mg EPC.kg⁻¹ de reprodutor (Marcos, 2012).

Após um período de 280 horas – grau, contadas a partir da aplicação hormonal (adaptado de Ludwig *et al.*, 2005), foi realizada a coleta individual do sêmen por meio de massagem abdominal no sentido céfalo – caudal (Bombardelli *et al.*, 2006). O sêmen foi coletado com ajuda de seringas e alocado em microtubos de 1,5 mL de volume. Após a coleta, o material obtido foi mantido sob refrigeração (Asturiano *et al.*, 2001).

Cada macho espermiante foi considerado uma unidade experimental. O volume de sêmen liberado foi aferido com o uso de seringa. Alíquotas de sêmen foram fixadas em formol salino, coradas com rosa de bengala e avaliadas quanto à normalidade das células espermáticas (Streit Jr. *et al.*, 2004). Como normalidade espermática, entende-se a ausência de alterações na morfologia de cabeça e/ou cauda do espermatozoide, que podem ser visualizadas em microscopia óptica.

O sêmen, ainda, foi submetido à verificação de motilidade por meio de análise computadorizada (CASA), em *software* livre (Sanches *et al.*, 2013; Neumann *et al.*, 2013).

Avaliação em microscopia eletrônica

Para a melhor descrição das células germinativas, alguns fragmentos de testículos e ovários fixados em solução de Karnovsky, foram pós- fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em acetona e incluídos em resina tipo araldite, para posterior observação em microscopia eletrônica de transmissão dos distintos tipos celulares e seus componentes.

Uma pequena parcela de sêmen foi fixada em solução de glutaraldeído 10% e submetida a protocolos de microscopia eletrônica de varredura, que incluem procedimentos de desidratação e metalização das amostras.

Os procedimentos e o tempo de permanência em cada etapa foram realizados segundo o protocolo padrão do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual Paulista de Botucatu (CME- Botucatu).

Análise de dados

Para a análise dos resultados, os dados morfológicos foram apresentados de forma descritiva, de modo a evidenciar as alterações ao longo do tempo, e ilustrados por meio de imagens. Outros parâmetros descritivos, como a frequência em cada fase, foram informados em valores percentuais.

Os dados de peso, comprimento padrão, índices gonadossomáticos, concentração de esteroides, variáveis de perímetro e área dos folículos, bem como os parâmetros seminais foram submetidos à análise de variância (*one way ANOVA*). Quando verificado efeito significativo foi aplicado o teste de Tukey.

Outliers e pontos extremos foram identificados e removidos das análises. Todos os testes foram realizados em nível de 5% de significância pelo *software Statistica*[®] 7.0.

Resultados

Os resultados serão apresentados para machos e fêmeas separadamente. As avaliações dos machos da segunda população serão apresentadas juntamente com os demais dados dos machos, em um subtítulo único.

A distinção de machos e fêmeas se fez pela observação das características externas da papila urogenital (Figura 1). As diferenças são sutis, mas de modo geral, a papila dos machos apresenta-se mais alongada e uma pequena abertura pode ser verificada no final dessa. Nas fêmeas, a papila urogenital é alargada e uma abertura é visualizada do início ao fim da projeção.

Em animais com menos de um ano esta diferença da papila não pode ser observada. Ainda, outros aspectos de dimorfismo sexual externo não foram verificados.

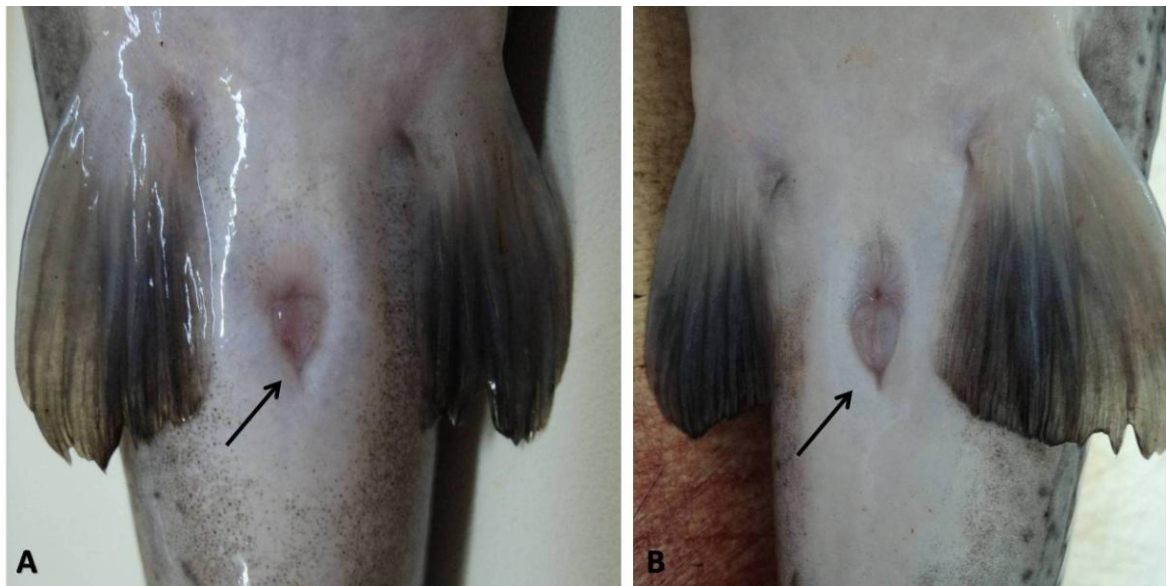


Figura 1: Caracterização sexual externa. → Papila urogenital de macho (A) e fêmea (B) de surubim do Iguaçu.

Machos

Parâmetros biométricos

Os animais apresentaram aspecto saudável ao longo de todo o acompanhamento e tiveram crescimento e ganho de peso gradual (Tabela 1). Quando observado, o índice gonadossomático (IGS) este apresentou oscilações ao longo dos meses e o pico da variável aconteceu em outubro de 2013 (34 meses de idade). Os maiores valores no ano anterior ocorreram em novembro. É interessante observar que, nos dois anos observados, após a ocorrência dos picos, o índice caiu bruscamente de um mês para outro (Tabela 1; Figura 2).

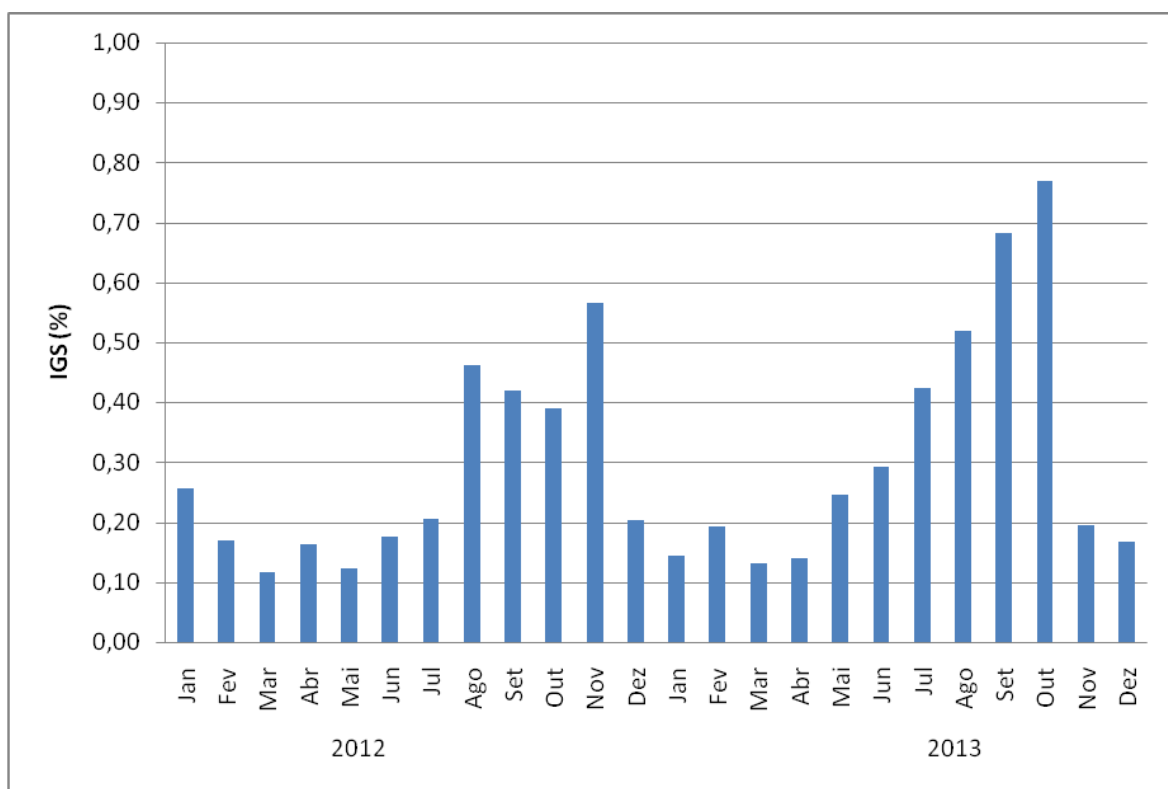


Figura 2: Índice gonadossomático de machos de surubim do Iguaçu ao longo de dois anos de avaliação (2012-2013). Em ordem cronológica, animais de 13 (Janeiro de 2012) a 36 (Dezembro de 2013) meses de idade.

Tabela 1: Parâmetros biométricos e concentração de testosterona de machos púberes de surubim do Iguaçú ao longo de dois anos de acompanhamento

Ano	Mês	Peso (g)	Comprimento padrão (cm)	IGS (%)	Testosterona (ng/mL)
2012	Jan	80,06 ±4,31 (5)	17,84 ±0,35 (5)	0,26±0,03(5)	2,23±0,45 (3)
2012	Fev	109,74±5,04 (5)	20,18 ±0,40 (5)	0,17±0,02(5)	5,31±0,97 (3)
2012	Mar	106,15 ±2,98 (4)	19,68 ±0,46 (4)	0,12±0,01 (4)	4,16±0,93(4)
2012	Abr	112,84 ±12,48 (4)	20,18 ±0,85 (4)	0,16±0,01 (4)	5,13±0,72(4)
2012	Mai	103,97 ± 5,41 (4)	19,30 ±0,54 (4)	0,12±0,01(4)	4,02±0,36 (4)
2012	Jun	123,21 ±6,94 (4)	20,73 ±0,38 (4)	0,18±0,03(4)	-
2012	Jul	103,70 ±8,93 (4)	19,65 ±0,43(4)	0,21±0,02(4)	5,38±0,15(4)
2012	Ago	104,41±5,49 (4)	19,25 ±0,48 (4)	0,46±0,08(4)	6,27±1,19(4)
2012	Set	134,79 ±11,0(4)	20,50 ±0,58 (4)	0,42±0,09(4)	5,19±0,92(4)
2012	Out	135,41±16,35 (4)	20,23 ±0,64 (4)	0,39±0,08(4)	6,43±1,00(4)
2012	Nov	158,73 ±16,28 (4)	21,45 ±0,70 (4)	0,57±0,24 (4)	8,47±0,57(4)
2012	Dez	183,51±10,13 (4)	23,35 ±0,39 (4)	0,20±0,02(4)	6,44±0,81(4)
2013	Jan	190,61±6,00 (4)	23,05 ±0,38 (4)	0,14±0,01(4)	18,47±5,81(4)
2013	Fev	211,28±12,97 (4)	24,85 ±0,56 (4)	0,19±0,03(4)	10,74±2,70(2)
2013	Mar	250,96±14,39(4)	25,93 ±0,77 (4)	0,13±0,01(4)	13,86±1,38(4)
2013	Abr	308,26±23,73 (4)	26,77 ±0,77(4)	0,14±0,01(4)	15,01±1,90(4)
2013	Mai	283,12±37,20 (4)	22,50 ±1,91(4)	0,25±0,03(4)	23,04±4,14(4)
2013	Jun	355,14±5,74 (5)	27,46 ±0,35 (5)	0,29±0,02(5)	25,21±8,58(5)
2013	Jul	280,60 ±28,90 (4)	26,38 ±0,83 (4)	0,42±,014(4)	15,39±3,16(4)
2013	Ago	323,45±53,21(4)	26,43 ±1,44 (4)	0,52±0,13(4)	23,46±7,99(4)
2013	Set	342,98±27,85 (5)	27,52 ±0,79(5)	0,68±0,19 (5)	66,55±14,78(4)*
2013	Out	370,43±37,92 (4)*	28,85 ±0,83(4)	0,77±0,07(4)*	69,85±16,72(3)*
2013	Nov	211,56±16,90 (4)	25,23 ±0,40 (4)	0,19±0,01(4)	22,27±5,53(4)
2013	Dez	356,67±47,71 (4)	29,10 ±1,16(4)*	0,17±0,04(4)	14,11±4,64(4)
2012		120,32±4,55 (50)	20,14 ±0,23(50)	0,27±0,03 (50)	5,44±0,31 (42)
2013		292,76±11,35(50)	26,22 ±0,36(50)	0,33±0,04(50)	26,21±3,35(46)
p valor		0,00	0,00	0,00	0,00

Valores apresentados em média±erro padrão da média (n). p valor referente à análise de variância em nível de 5% de significância. * Indicam as médias mensais significativamente maiores pelo teste de Tukey.

Análise de esteroides

Em relação aos esteroides, a concentração de testosterona variou de forma similar ao índice gonadossomático (IGS) (Tabela 1). Os maiores valores ocorreram em 2013, apresentando pico em setembro e outubro e brusca redução dos valores nos meses seguintes (Figura 3).

A concentração de estradiol foi obtida para os animais, no segundo ano de coleta (2013) e o pico deste esteroide aconteceu em outubro (Figura 4), tal como a testosterona o pico foi seguido de queda.

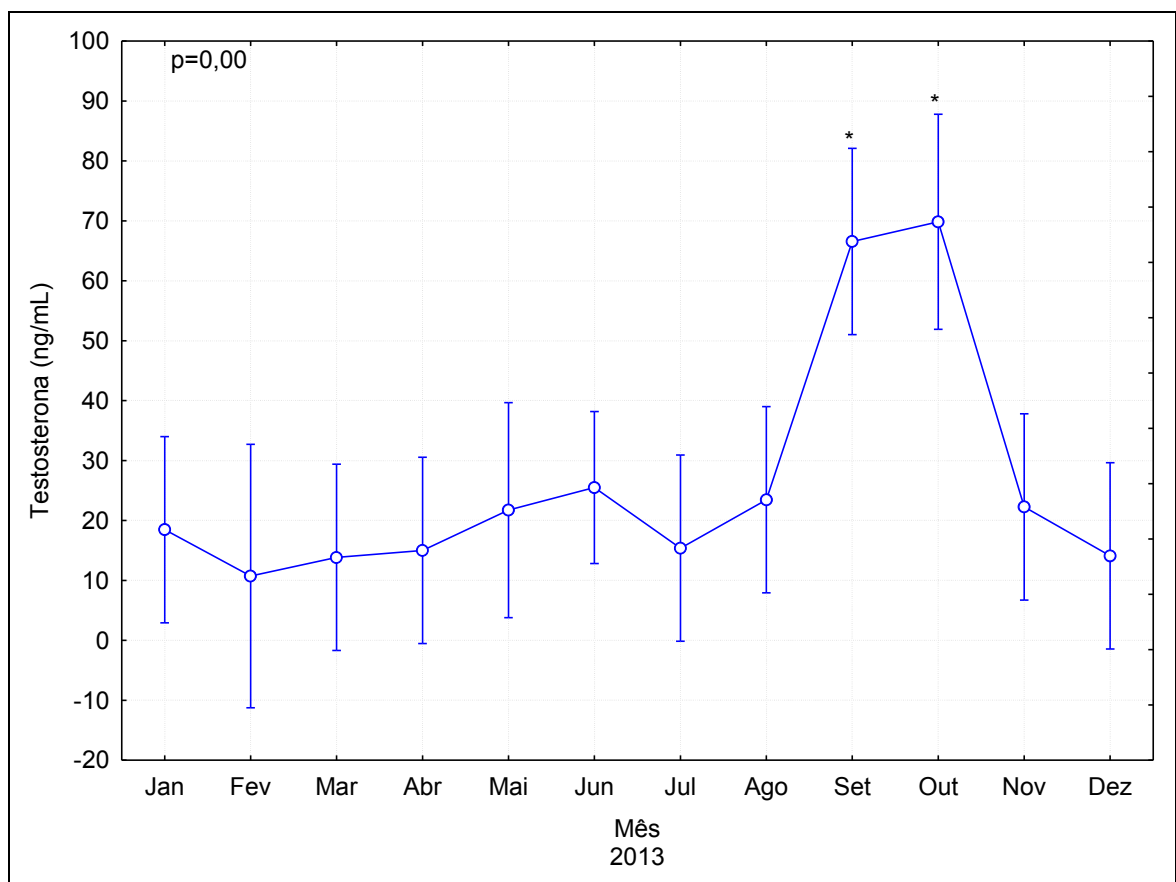


Figura 3: Variação da testosterona plasmática de machos púberes de surubim do Iguazu ao longo de 2013. * Indica o pico do esteroide pelo teste de Tukey.

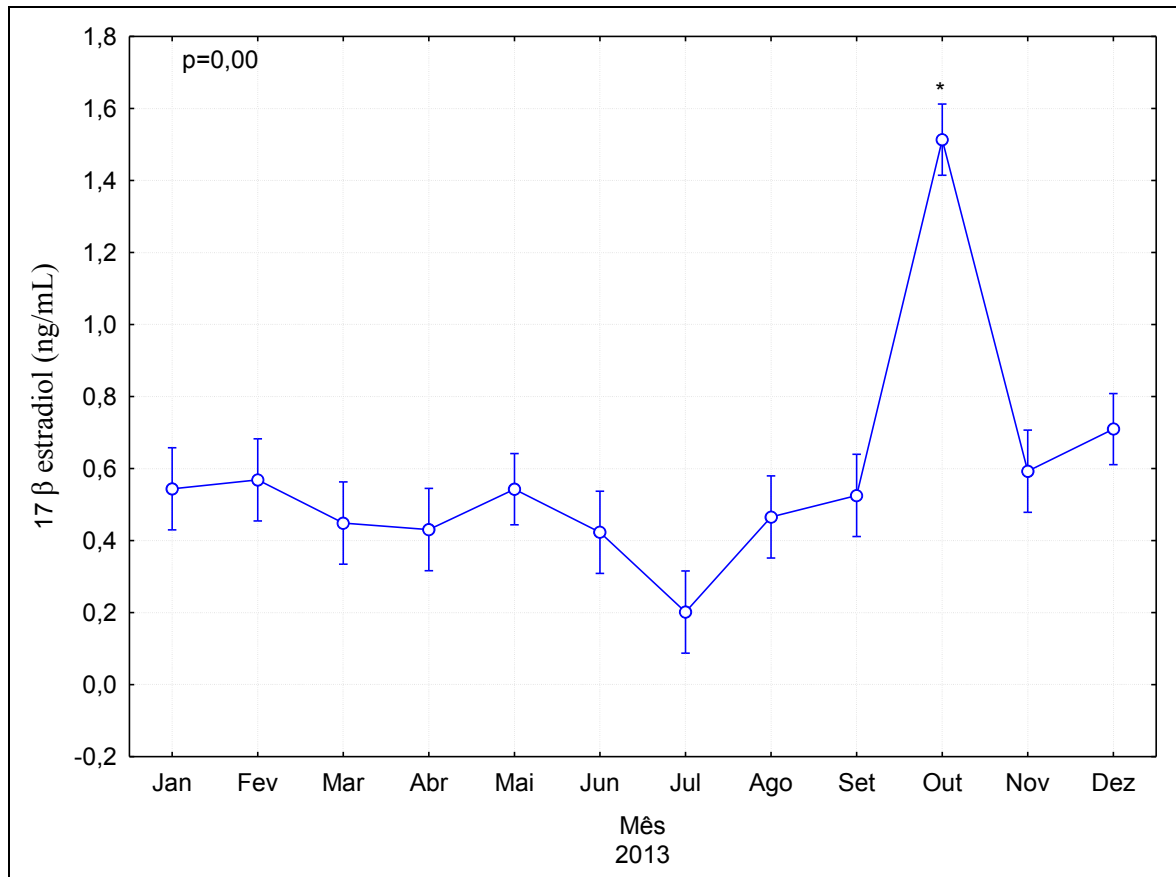


Figura 4: Variação do estradiol plasmático de machos púberes de surubim do Iguaçu ao longo de 2013. * Indica o pico do esteróide pelo teste de Tukey.

Evolução das células germinativas

As espermatogônias são recrutadas e envolvidas por células de Sertoli que darão origem aos cistos. Todo o processo de modificação das células germinativas acontece dentro destes cistos, dispostos ao longo dos túbulos seminíferos (Figura 5).

As espermatogônias proliferam-se, por mitose e algumas são recrutadas para a diferenciação. Inicia-se a meiose que dará origem aos espermátócitos que na sequência da divisão tornam-se espermátides. Estas sofrerão alterações diversas dando origem aos espermatozoides, que são liberados do cisto para a luz dos túbulos. As diversas alterações nas espermátides incluem a compactação do núcleo, redução do citoplasma e formação do flagelo (Figura 6).

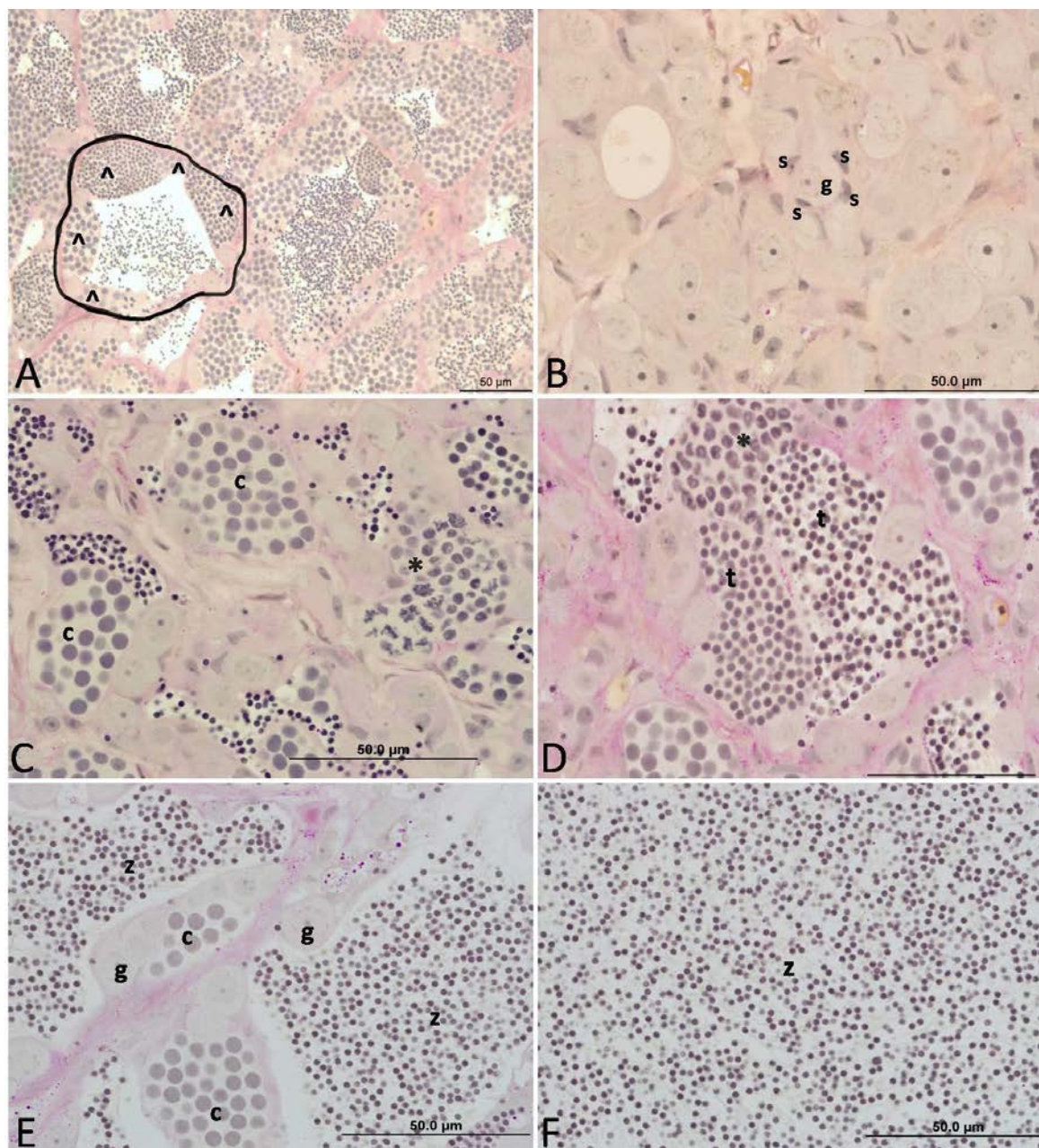


Figura 5: Cistos contendo células em diferenciação. A) delimitação dos túbulos e organização dos cistos (^); B) células de Sertoli (s) envolvendo as espermatogônias (g); C) espermatócitos (c) e D) espermátides (t) e cistos em divisão celular (*); E e F) espermatozoides livres na luz do túbulo.

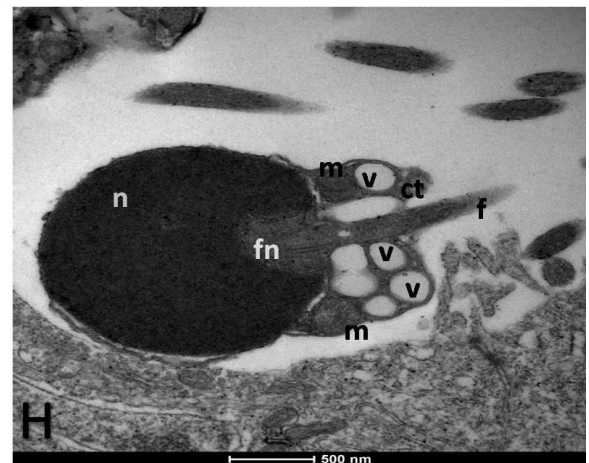
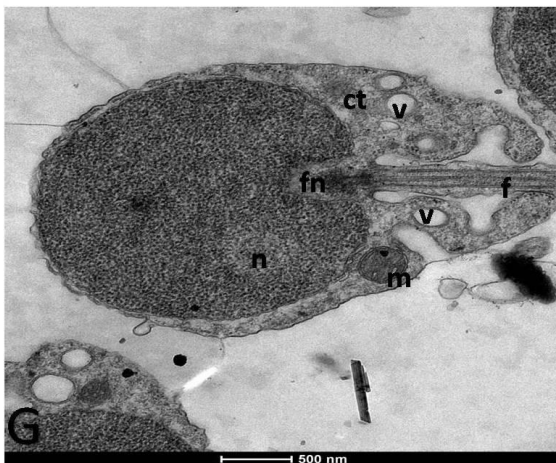
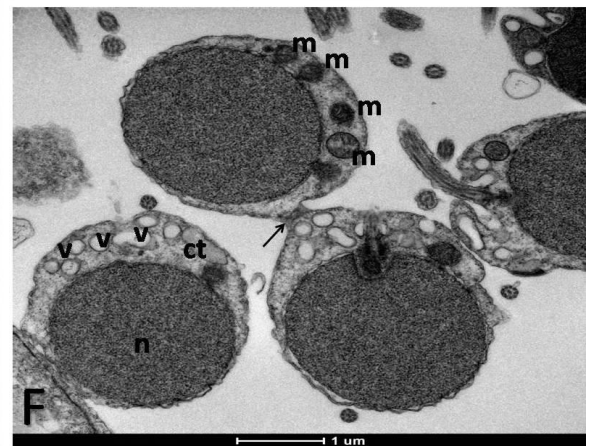
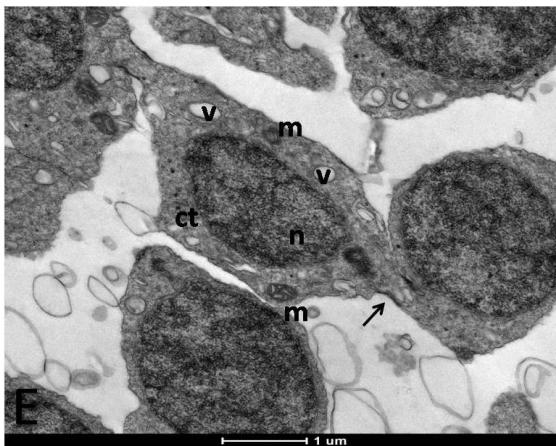
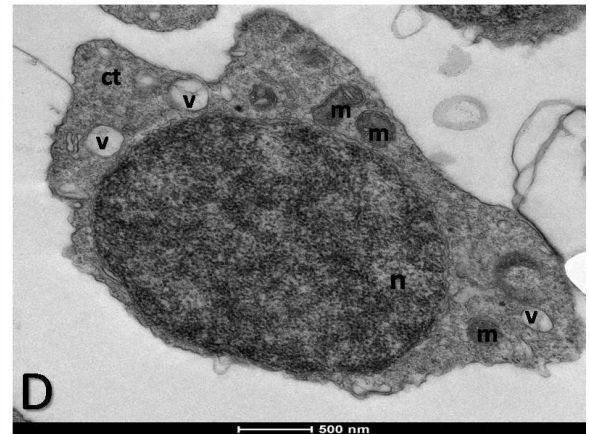
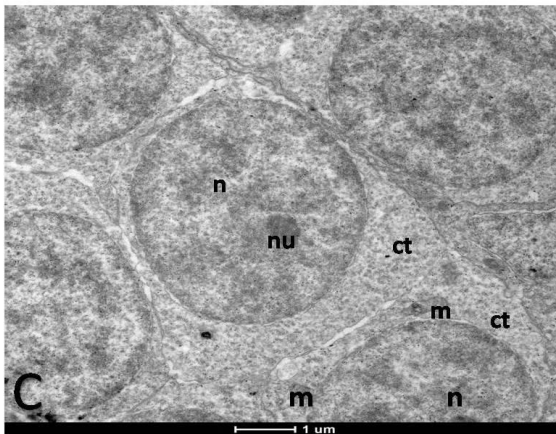
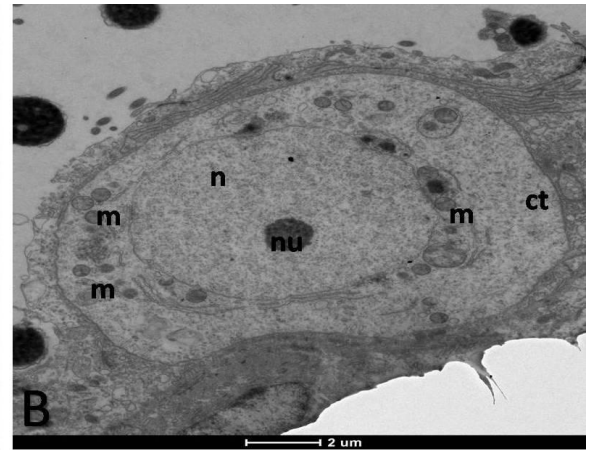
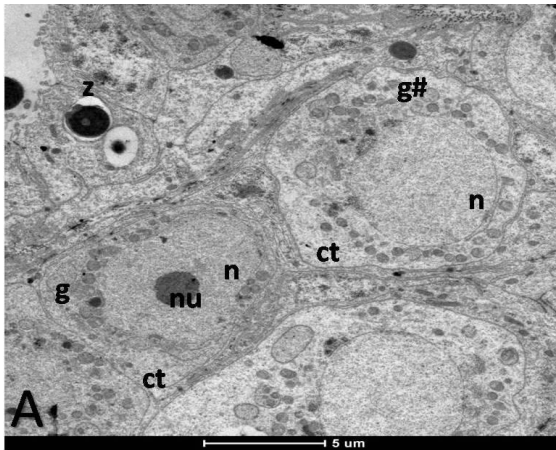


Figura 6: Evolução das células da linhagem germinativa. Microscopia eletrônica de Transmissão (M.E.T.). A) espermatogônias diferenciadas (g) e indiferenciadas (g#); B) espermatogônia diferenciada; C) espermatócito; D, E, F e G) espermatídes em vários estágios; H) espermatozoide. Observar a redução da célula e alterações na quantidade de citoplasma (ct) e compactação do núcleo (n) ao longo das modificações. As espermatídes permanecem unidas por pontes citoplasmáticas (→) e continuam perdendo citoplasma, ainda as mitocôndrias organizam-se e as vesículas começam a aparecer. Fossa nuclear (fn) e flagelo (f) começam a ser formados (E e F). Por fim as espermatídes separam-se e ocorre maior compactação do núcleo e formação do flagelo (f), o citoplasma fica restrito à peça intermediária e a uma estreita faixa ao redor do núcleo e do axonema do flagelo. Finalmente a célula torna-se um espermatozoide (H). (n= núcleo, nu= nucléolo, ct= citoplasma, m= mitocôndria, v= vesícula, fn= fossa nuclear, f= flagelo).

Ciclo reprodutivo

A organização em cistos e todos os tipos celulares da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócito, espermatídes e espermatozoides) puderam ser claramente visualizados (Figura 7) e permitiram a observação das fases reprodutivas. Os machos apresentaram todas as fases do ciclo reprodutivo (desenvolvimento, apto a espermiar, regressão e regeneração) e observou-se a ocorrência de animais imaturos (Figura 8).

A alternância destas fases (com exceção da fase de “desenvolvimento” que se estendeu) pode ser considerada rápida e o aspecto macroscópico do testículo foi condizente com os aspectos microscópicos. As primeiras avaliações revelaram machos imaturos, ou seja, testículos pequenos e transparentes, acompanhados de um epitélio germinativo contendo apenas espermatogônias. Mais informações sobre os machos imaturos serão apresentados na sequência.

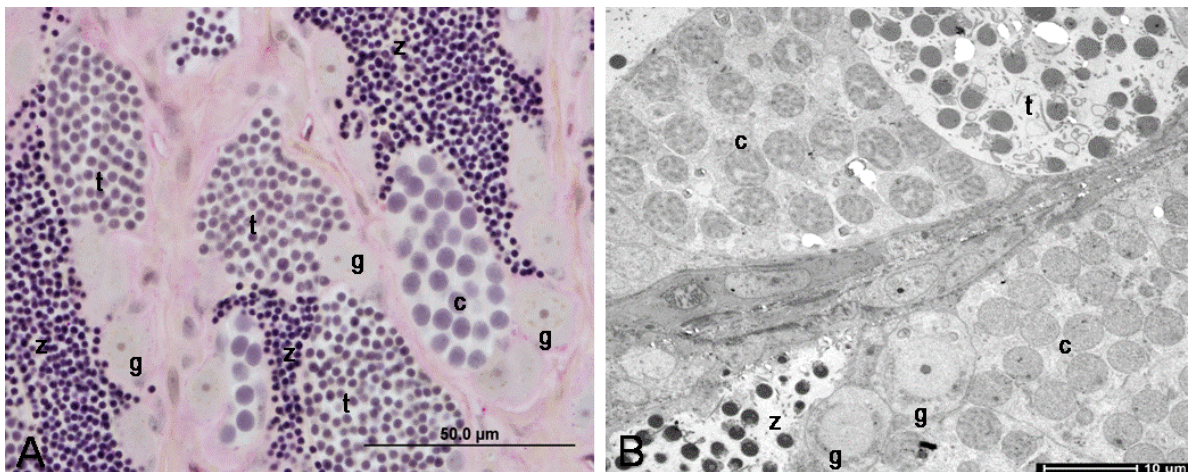


Figura 7: Organização dos tipos celulares em cistos. A) visualização dos cistos em microscopia óptica; B) Visualização dos cistos em microscopia eletrônica de transmissão. (g= espermatogônia; c= espermatócito; t= espermatíde; z= espermatozoides).

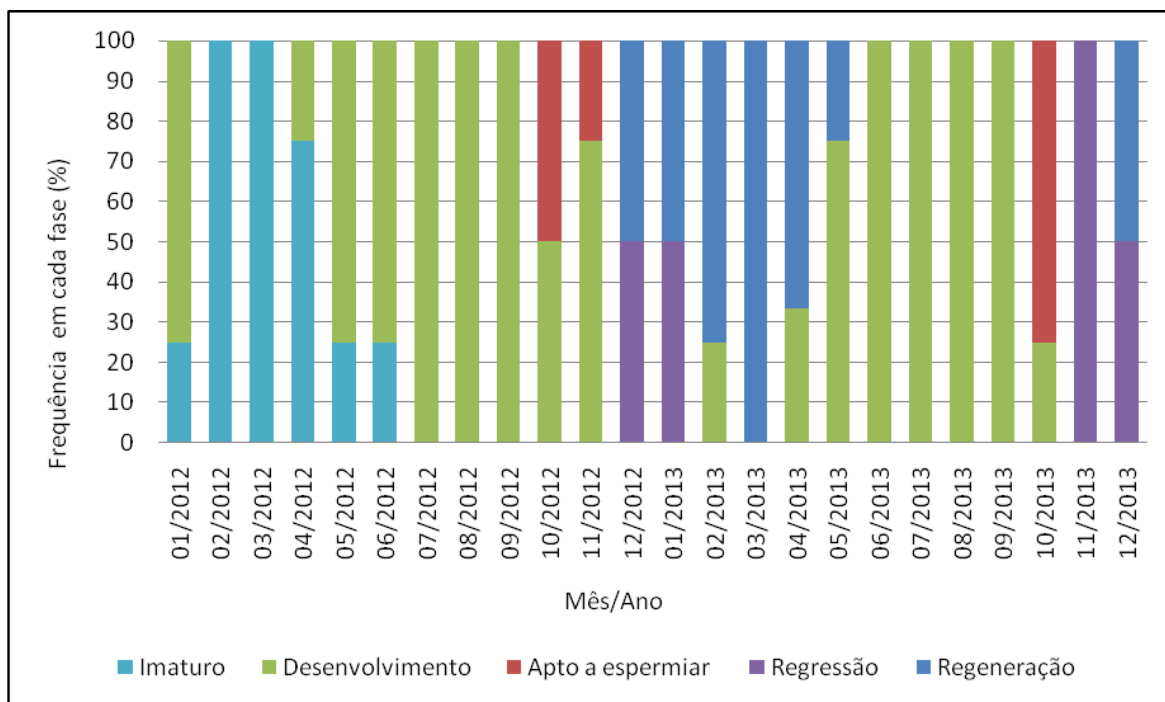


Figura 8: Distribuição das fases de desenvolvimento gonadal de machos púberes de surubim do Iguaçu ao longo de janeiro de 2012 a dezembro de 2013

Com cerca de 16 meses de idade (abril de 2012), os animais apresentaram aumento evidente de volume e alteração na coloração do testículo, que tornou-se esbranquiçado e mais túrgido (Figura 9A). A presença de espermátides e espermatozoides apresentou incremento aparente ao longo das avaliações, caracterizando a fase de —desenvolvimento” (Figura 9B).

Conforme ocorria o aumento do volume do testículo, houve o aparecimento de dobramentos ao longo do órgão (Figura 9C). Na verificação histológica, ocorreu um aumento nos espermatócitos, enquanto as espermátides passaram a ser mais frequentes e quantidades maiores de espermatozoides puderam ser visualizadas, bem como pôde ser verificada uma descontinuidade no epitélio germinativo e a presença de espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos, tornando os machos —aptos a espermiar” (Figura 9D). Os primeiros animais aptos a espermiar foram observados com cerca de 22 meses de idade e a ocorrência deste evento registrada no período de primavera (outubro e novembro).

Após esta etapa, que persistiu por poucas semanas, a aparência das gônadas e dos tipos celulares se alterou. Os testículos eram longos, flácidos e de coloração rosada (Figura 9E) e quando vistos ao microscópio, apresentaram grande quantidade de vasos sanguíneos e espermatogônias, espermatozoides residuais e ausência de cistos de espermatídes e poucos cistos de espermatócitos, características atribuídas à fase de “regressão” (Figura 9F). Alguns peixes apresentaram quantidade reduzida de espermatozoides residuais e espermatócitos, ou mesmo ausência destes, caracterizando a fase de “regeneração” (Figura 9G; 9H).

Após a “regeneração” os animais retornam para a fase de “desenvolvimento” dando continuidade ao ciclo reprodutivo, que se repetiu nos meses seguintes e apresentou intervalos em cada fase de forma muito semelhante.

A distribuição das amostras em cada uma das fases, ao longo dos meses, está apresentada na figura 8 e os valores estão apresentados em valores percentuais.

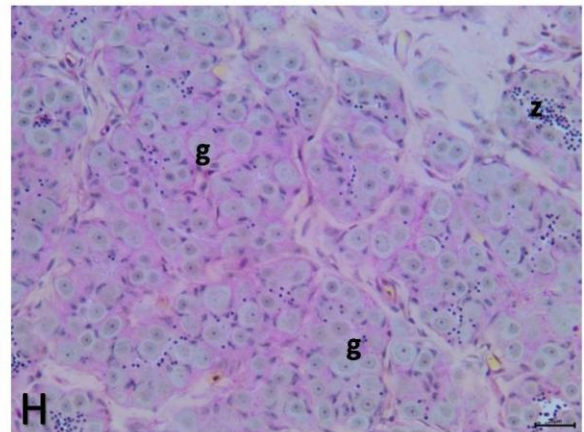
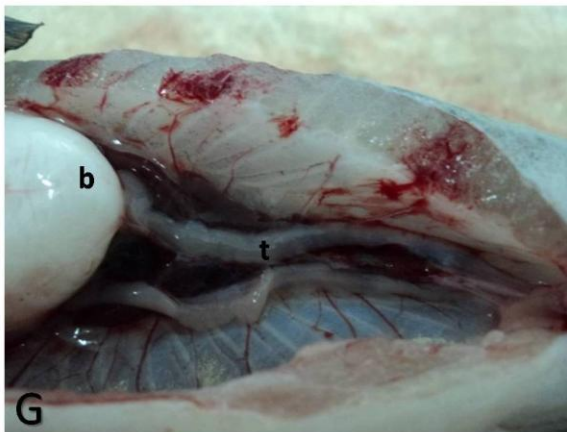
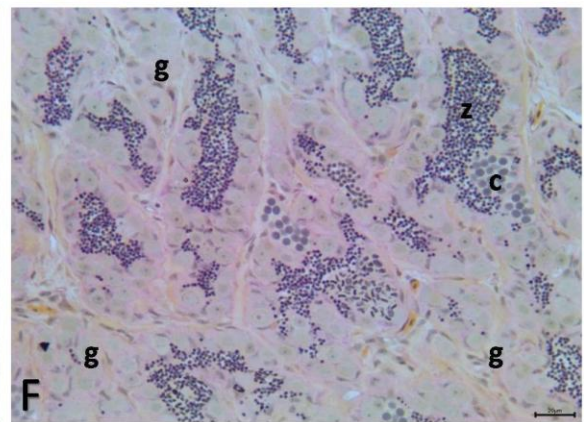
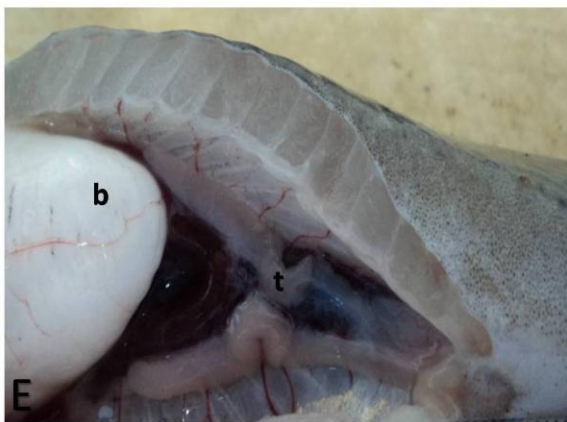
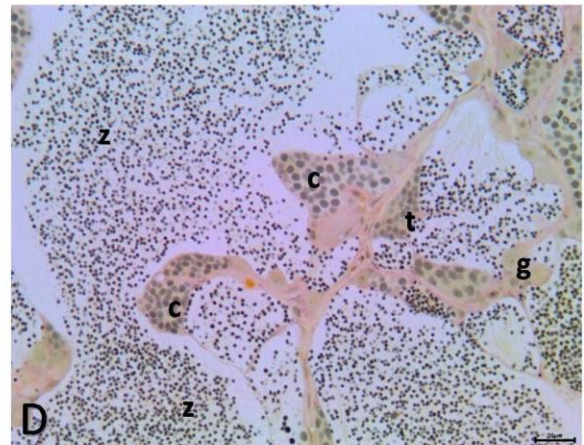
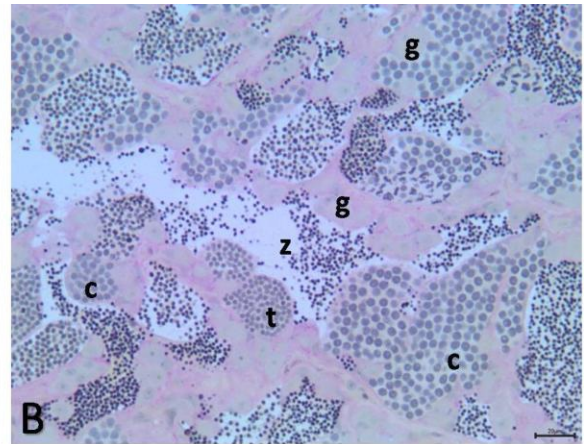
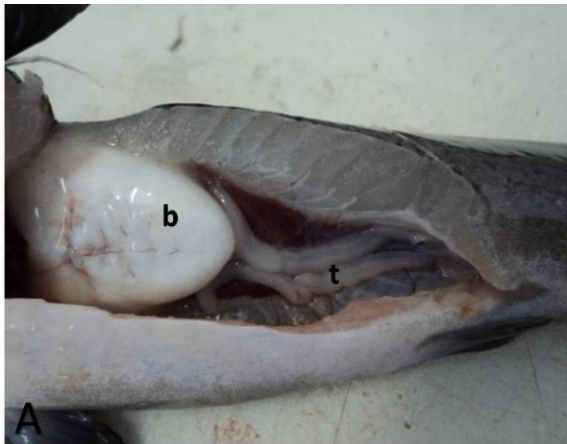


Figura 9: Fases do ciclo reprodutivo de machos de surubim do Iguaçu. A e B) macho em desenvolvimento: Testículo pequeno e esbranquiçado, com presença de todos os tipos de células germinativas, abundância de espermatogônias (g), espermatócitos (c) e espermatídes (t) e alguns espermatozoides (z); C e D) macho apto a espermiar: Testículo volumoso e túrgido, com presença de cistos em diferenciação, mas presença massiva de espermatozoides (z); E e F) macho em regressão: Testículo flácido, rosado em função do aumento dos vasos sanguíneos (v), presença de espermatozoides residuais e repovoamento de espermatogônias (g); G e H) macho em regeneração: Testículo menor, menos flácido e redução dos vasos sanguíneos e dos espermatozoides residuais (z), espermatogônias povoando todo o testículo. Aspectos macroscópicos ilustrados em A, C, E e G: bexiga natatória (b) e testículo (t).

Análise de sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas ao longo de novembro de 2012 a novembro de 2013. A liberação de sêmen não aconteceu em muitos meses e os melhores resultados foram obtidos em setembro e outubro, nestes meses todos os machos submetidos à manipulação reprodutiva responderam positivamente, e foram verificadas as maiores médias de motilidade (Tabela 2).

O volume de sêmen liberado variou, individualmente, entre 20 e 1000 μ L de sêmen. As médias mensais de volume seminal estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Percentual de machos espermiantes e parâmetros seminais e espermáticos de machos púberes de surubim do Iguaçu

Ano	Mês	Machos espermiantes (%)	Volume seminal (μ L)	Motilidade (%)	Normalidade (%)
2012	Nov	60	43,33 \pm 6,67 (3)	82,42 \pm 6,77 (3)*	60,37 \pm 5,39(3)
2012	Dez	20	100 (1)	27,49 (1)	68,64 (1)
2013	Jan	0	-	-	-
2013	Fev	0	-	-	-
2013	Mar	0	-	-	-
2013	Abr	50	200 (1)	77,60 (1)	75 (1)
2013	Mai	40	375 \pm 125 (2)	91,21 \pm 1,83 (2)*	-
2013	Jun	80	40 \pm 10(3)	73,98 \pm 7,82 (3)	70,98 \pm 3,96 (3)
2013	Jul	75	66,67 \pm 16,67(3)	55,99 \pm 16,71 (3)	61,39 (1)
2013	Ago	60	175 \pm 75(2)	79,35 \pm 7,68 (2)	69,89 \pm 2,89(2)
2013	Set	100	525 \pm 170,17(4)	90,19 \pm 20,3 (4)*	65,62 \pm 0,37(4)
2013	Out	100	258,3 \pm 149,67(5)	89,63 \pm 0,93 (4)*	64,74 \pm 0,92(4)
2013	Nov	80	116,67 \pm 44,10(3)	77,47 \pm 3,91 (3)	59,30 \pm 3,63(3)
Média		-	179,63 \pm 40,74(27)	78,37 \pm 3,41(27)	65,37 \pm 1,33(22)
p			0,27	0,00	0,14

Valores informados em media \pm erro padrão (n). p valor referente à análise de variância, com 5% de significância. * Indicam as médias mensais significativamente maiores pelo teste de Tukey.

Características dos espermatozoides

A presença de espermatozoides foi abundante na fase de aptidão reprodutiva. Esta célula foi observada em microscopia eletrônica e apresentou cabeça arredondada, cromatina bastante condensada e fossa nuclear evidente (Figura 10). Na peça intermediária, estão presentes vesículas de tamanhos variados e as mitocôndrias são pouco numerosas, têm aspecto arredondado e aparecem circundando a base do núcleo. O flagelo é único, com o arranjo clássico de microtúbulos formado por um par central e nove duplas periféricas (Figura 11).

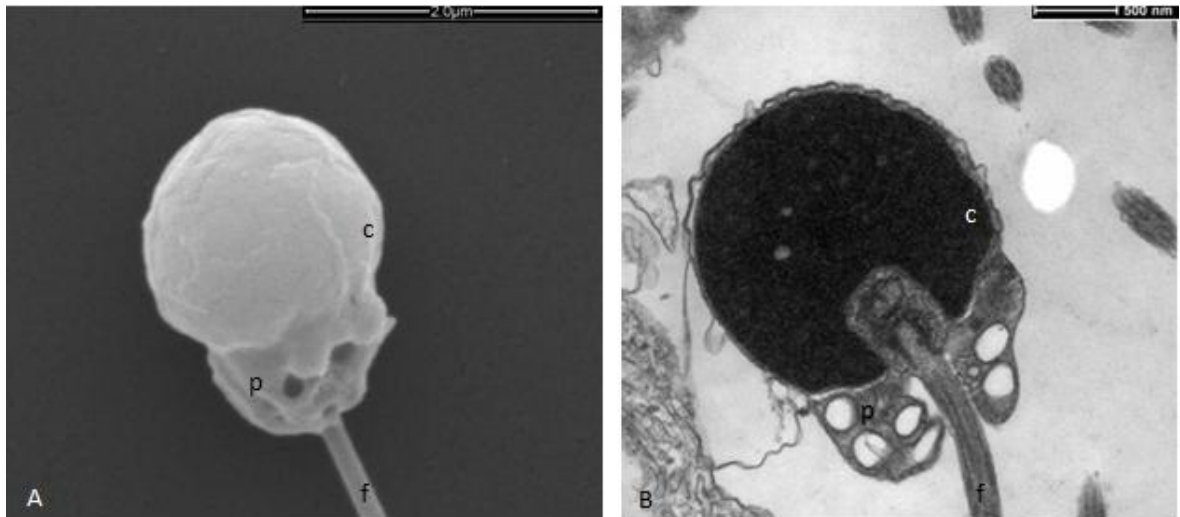


Figura 10: Aspecto microscópico do espermatozoide de surubim do Iguçu. A) Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.); B) Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.). (c= cabeça; p= peça intermediária; f= flagelo). Reparar que o aspecto rugoso da peça intermediária se dá pela presença de vesículas.

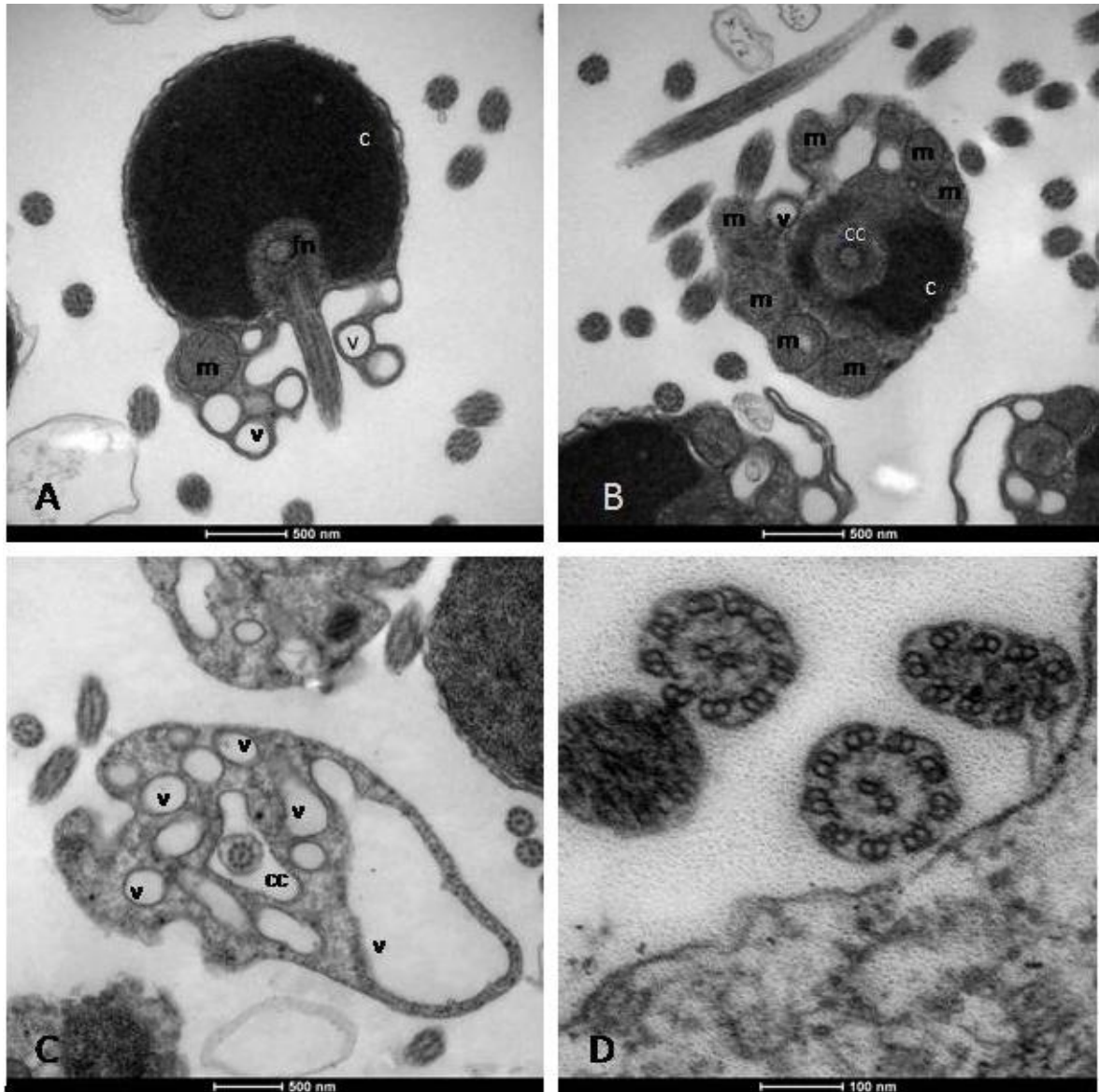


Figura 11: Detalhes do espermatozoide em Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.). A) Aspecto geral do espermatozoide. B) corte transversal da base do núcleo. Reparar a organização das mitocôndrias. C) presença de vesículas na peça intermediária. D) Axonema e seu arranjo de microtúbulos (m=mitocôndria; v=vesícula; fn= fossa nuclear; c= cabeça; cc= canal citoplasmático).

Machos imaturos e primeira onda espermática

Como citado, coletas extras de machos com 4, 8 e 11 meses de idade foram conduzidas para novas informações. Estes animais foram coletados de uma segunda população, dos tanques de cultivo da Estação Experimental de Estudos Ictiológicos da Companhia Paranaense de Energia Elétrica (EEEI-COPEL) localizados em Reserva do Iguaçu, PR, seguindo os padrões metodológicos já descritos.

A observação destes peixes confirmou que os machos da espécie não apresentam ciclo reprodutivo antes de um ano de idade e que os espermatozoides que aparecerem em algumas amostras parecem ser evidências de uma “primeira onda de espermatozoides” que, neste caso, acontece antes de os animais entrarem na fase de desenvolvimento.

A ocorrência da onda foi registrada pela observação dos testículos e da verificação histológica. As características macroscópicas dos testículos eram de órgãos pequenos, finos, transparentes e pouco volumosos (Figura 12A). Na lâmina, observou-se a presença massiva de espermatogônias e presença de alguns espermatozoides em meio a elas. Observou-se no material, reduzida presença ou ausência de outras fases de desenvolvimento celular, pequena quantidade de vasos sanguíneos de maior calibre e aparente continuidade do epitélio em torno destes grupos de espermatozoides.

Assim, a sequência dos eventos parece ser a de proliferação e povoamento do testículo pela espermatogônias, sendo que algumas entram em processo de diferenciação e produzem os primeiros espermatozoides, que ficam retidos em meio às demais espermatogônias. O resultado é um animal imaturo, mas com alguns espermatozoides formados (Figura 12D). Células que só serão produzidas em grande quantidade durante a fase de desenvolvimento, que acontece na sequência dos eventos.

Os peixes coletados nesta segunda etapa também foram avaliados em relação às fases reprodutivas e foram observados apenas animais imaturos e em desenvolvimento (Figura 13).

A fase de desenvolvimento pôde ser verificada nos machos com 11 meses de idade, o que é precoce em relação à população que foi acompanhada por 2 anos, em que animais imaturos foram capturados com até 16 meses de idade.

É interessante observar, também, que mesmo tratando-se de animais imaturos, a concentração plasmática de testosterona, sofreu um aumento na mesma época do ano (primavera) em que os animais da primeira população, que eram mais velhos (Tabela 3; Tabela 1).

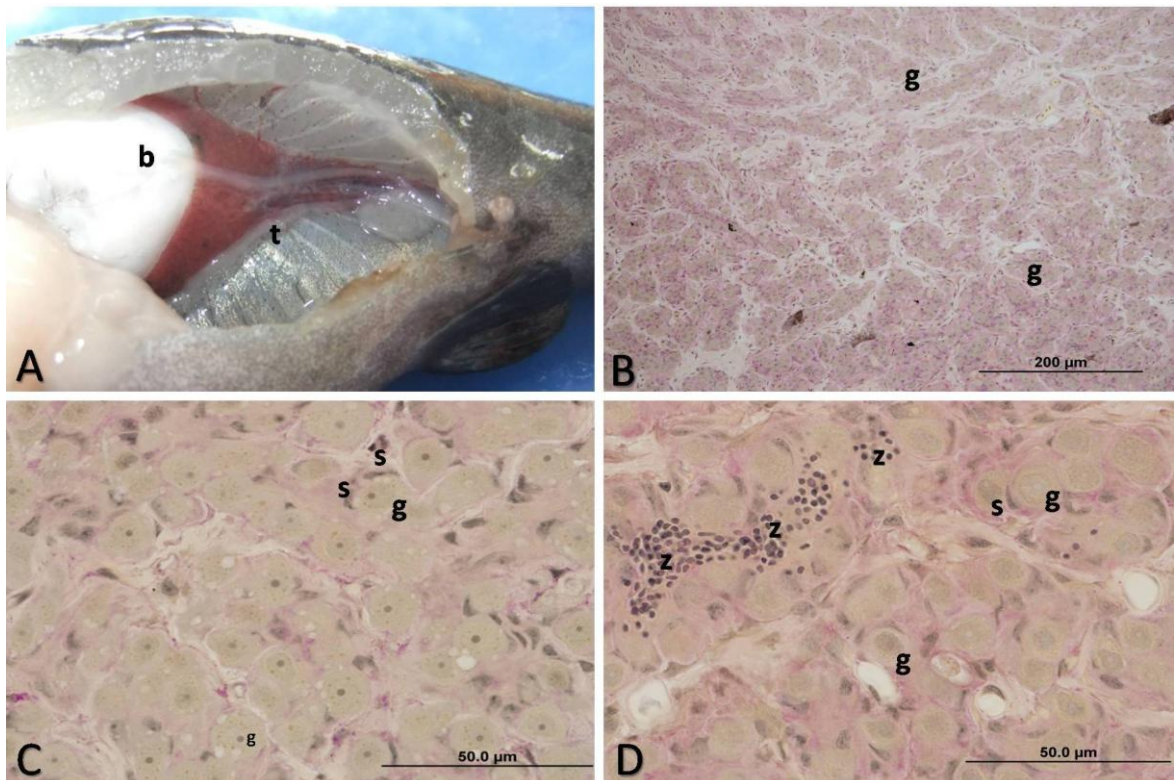


Figura 12: Aspectos de testículo imaturo de surubim do Iguaçu. A) aspecto macroscópico do testículo. Órgão pequeno, pouco espesso, transparente e de aspecto homogêneo (liso), características externas semelhantes para todos os aspectos microscópicos descritos (b= bexiga natatória, t= testículo). B) visão panorâmica do testículo (40x), com abundância de cistos de espermatogônias (g). C) Detalhe das espermatogônias (g) e células e Sertoli (s) (100x). D) Predominância de espermatogônias (g), mas ocorrência de espermatozoides (z) em meio e estas (100x). Coloração em PAS+Metanyl Yellow.

Tabela 3: Parâmetros biométricos, índice gonadosomático e concentração plasmática de testosterona de machos juvenis de surubim do Iguçu.

Parâmetro Idade	Peso médio (g)	Comprimento padrão (cm)	IGS (%)	Testosterona (ng/mL)
4 meses (Mai)	45,80±2,22 (5)	12,64±0,18 (5)	0,08±0,00 (5)	4,95±1,88 (5)
8 meses (Set)	50,33±3,38 (3)	13,73±0,20 (3)	0,08±0,01 (3)	17,14±1,68 (2)*
11 meses (Dez)	114,5±24,4 (4)*	18,25±1,41 (4)*	0,09±0,00 (4)	7,54±1,53 (4)
p valor	0,01	0,00	0,73	0,01

Valores apresentados em média±erro padrão da média. p valor referente à análise de variância em nível de 5% de significância. * Indicam as médias significativamente maiores pelo teste de Tukey

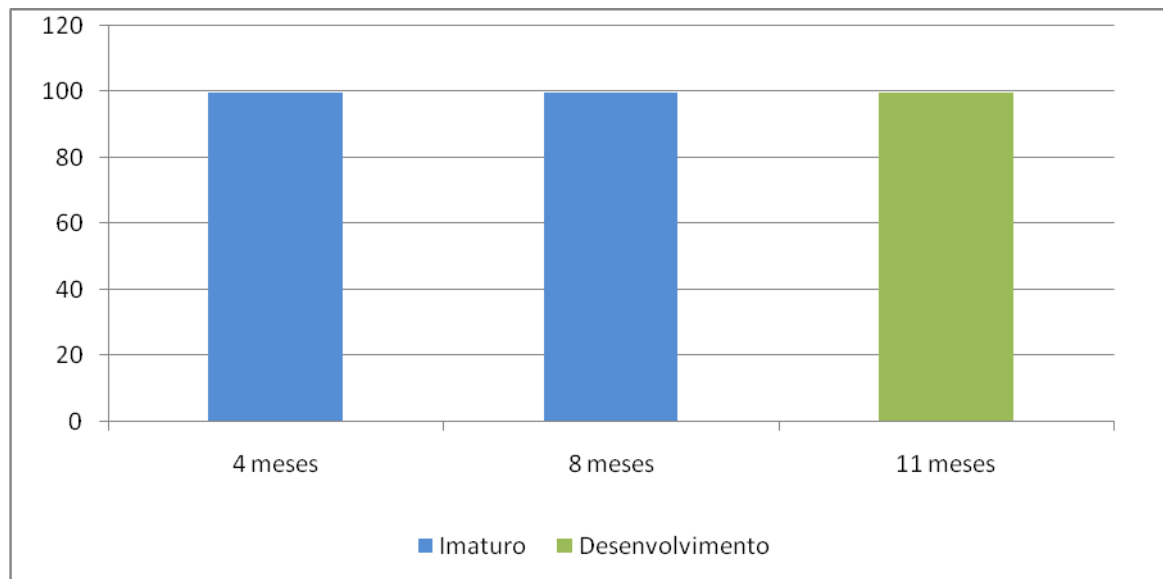


Figura 13: Distribuição das fases de desenvolvimento gonadal de machos de surubim do Iguçu, com menos de um ano de idade.

Fêmeas

Parâmetros biométricos

As fêmeas foram acompanhadas por mais tempo do que os machos e as coletas prosseguiram até o 48º mês de idade (dezembro de 2014). Assim como os machos, os dados observados de peso e comprimento padrão indicam um desenvolvimento gradual dos parâmetros, ao longo dos meses (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros biométricos e índice gonadossomático das fêmeas de surubim do Iguazu, criadas em cativeiro.

Ano	Mês	Peso médio (g)	Comprimento padrão (cm)	IGS (%)
2012	Jan	86,72±5,57 (6)	18,50±0,51(6)	0,29±0,00(5)
2012	Fev	99,43±5,75(4)	19,48±0,37(4)	0,22±0,00(4)
2012	Mar	102,01±9,73 (6)	18,78±0,55(6)	0,26±0,02(6)
2012	Abr	116,30±7,89(6)	20,17±0,43(6)	0,22±0,03(6)
2012	Mai	144,24±28,83(4)	20,18±0,55(4)	0,23±0,04(4)
2012	Jun	117,05±7,37(4)	20,00±0,30(4)	0,29±0,03(4)
2012	Jul	109,66±10,17(6)	19,03±0,68(6)	0,23±0,02(6)
2012	Ago	113,60±11,96(4)	19,53±0,79(4)	0,25±0,07(4)
2012	Set	137,98±9,79(4)	20,35±0,56(4)	0,25±0,03(4)
2012	Out	149,26±18,30(4)	20,88±1,07(4)	0,24±0,04(4)
2012	Nov	177,70±9,78(4)	22,30±0,44(4)	0,35±0,03(4)
2012	Dez	206,87±8,40(4)	24,03±0,28(4)	0,37±0,02(4)
2013	Jan	227,97±9,03(4)	25,03±0,25(4)	0,36±0,07(4)
2013	Fev	223,02±11,48(4)	24,75±0,44(4)	0,37±0,02(4)

2013	Mar	196,11±2,72(4)	24,59±0,67(7)	0,36±0,03(7)
2013	Abr	244,29±6,07(4)	24,80±0,25(4)	0,42±0,03(4)
2013	Mai	349,54±25,32(4)	26,93±0,72(4)	0,27±0,05(4)
2013	Jun	343,89±19,30(4)	27,75±0,48(4)	0,28±0,09(4)
2013	Jul	275,92±27,51(6)	26,02±0,68(6)	0,45±0,03(6)
2013	Ago	382,68±32,04(4)	27,35±1,00(4)	0,36±0,03(4)
2013	Set	324,27±40,95(3)	27,37±1,00(3)	0,37±0,02(3)
2013	Out	347,69±18,36(4)	28,23±0,62(4)	0,48±0,01(4)
2013	Nov	331,29±40,54(4)	28,70±1,09(4)	0,52±0,03(4)
2013	Dez	383,26±42,84(5)	29,48±0,98(5)	0,51±0,00(4)
2014	Jan	235,25±8,43(5)	26,36±0,34(5)	0,61±0,03(5)
2014	Fev	356,07±18,76(4)	29,60±0,45(4)	0,50±0,02(4)
2014	Mar	309,43±34,50(4)	28,70±0,94(4)	0,61±0,07(4)
2014	Abr	353,70±52,06(3)	27,50±2,47(3)	0,60±0,06(3)
2014	Mai	285,42±19,18(4)	27,00±0,44(4)	0,68±0,02(4)
2014	Jun	398,04±49,94(4)	30,25±1,84(4)	0,59±0,05(4)
2014	Jul	382,33±42,33(3)	29,80±0,89(3)	0,52±0,00(3)
2014	Ago	397,60±23,64(4)	27,33±2,45(4)	0,60±0,05(4)
2014	Set	353,83±17,96(4)	30,75±0,43(4)	0,69±0,04(4)
2014	Out	269,56±31,46(3)	28,83±1,17(3)	0,59±0,07(3)
2014	Nov	411,82±45,87(4)*	32,78±1,08(4)*	0,68±0,05(4)
2014	Dez	421,94±15,29(3)*	32,07±0,07(3)	0,79±0,09(3)*

Média anual 2012	126,30±5,35 (56)	20,10±0,25(56)	0,27±0,01(55)
Média anual 2013	302,61±11,40(50)	26,64±0,30(53)	0,39±0,02(52)
Média anual 2014	344,61±11,97(45)	29,16±0,43(45)	0,62±0,02(45)
Mês	0,00	0,00	0,00

Valores apresentados em média±erro padrão da média (n). p valor referente à análise de variância em nível de 5% de significância. * Indicam as médias significativamente maiores pelo teste de Tukey.

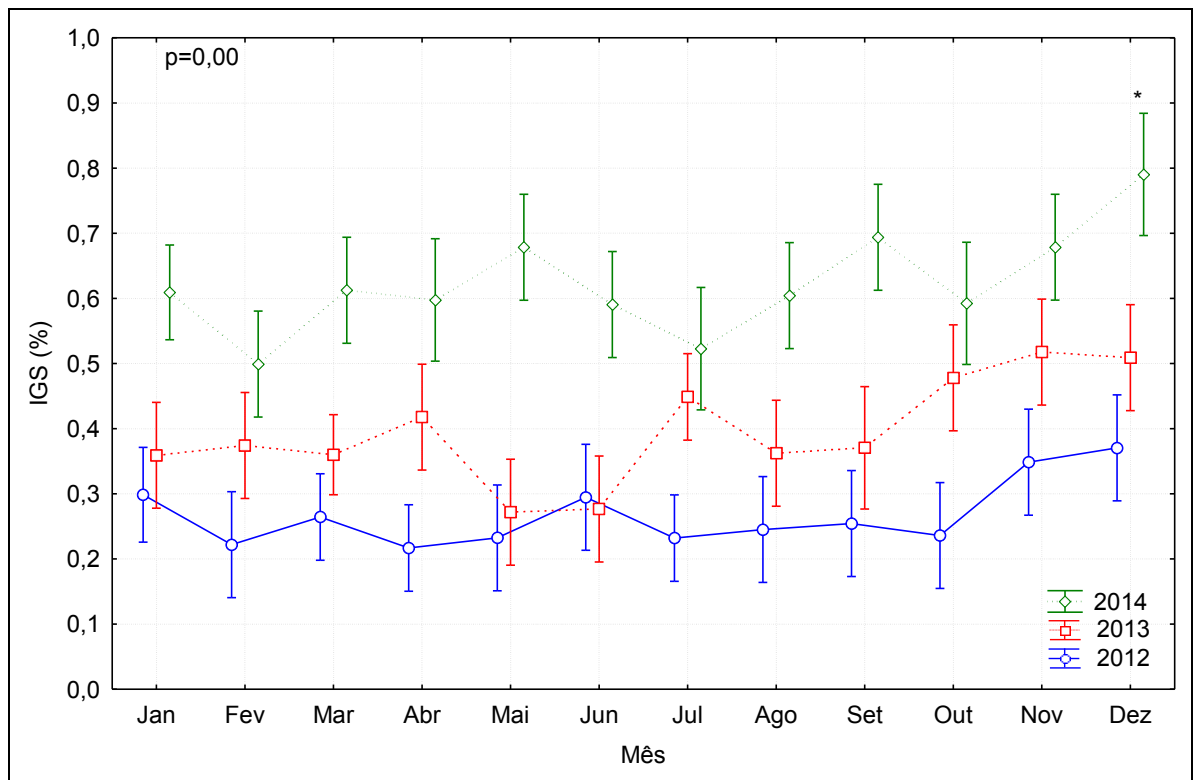


Figura 14: Índice gonadossomático de fêmeas imaturas de surubim do Iguazu, ao longo dos anos. Em ordem cronológica, fêmeas de 13 (janeiro de 2012) a 48 (dezembro de 2014) meses de idade. * Indica média significativamente maior pelo teste de Tukey.

Análise de esteroides

A flutuação hormonal das fêmeas foi semelhante àquela verificada para os machos, com picos acontecendo nos meses finais do ano. Mesmo com as amostras avaliadas sendo de anos diferentes, testosterona e estradiol apresentaram seus picos ao mesmo período (Tabela 5).

Tabela 5: Quantificação de esteroides sexuais (testosterona e estradiol) em fêmeas de surubim do Iguaçu, ao longo do tempo.

Mês/Ano	Testosterona (ng/mL)		17 β-estradiol (ng/mL)	
	2012	2013	2013	2014
Jan	2,20±0,43 (4)	16,69±7,82(4)	0,51±0,04 (4)	0,70±0,17(4)
Fev	2,16±0,18(4)	10,99±1,79(4)	0,83±0,06(4)	0,82±0,06(4)
Mar	2,33±0,31(6)	5,39±1,33(7)	0,59±0,03(4)	0,60±0,07(4)
Abr	2,38±0,24(6)	8,64±1,84(4)	0,51±0,03(3)	0,56±0,20(2)
Mai	6,21±0,78(4)	2,55±0,48(4)	0,64±0,05(4)	0,51±0,03(4)
Jun	-	6,45±1,22(4)	0,36±0,05(3)	0,64±0,06(4)
Jul	4,20±0,37(6)	9,26±5,85(6)	0,17±0,00(4)	0,60±0,03(3)
Ago	4,02±0,79(4)	10,88±3,65(4)	0,70±0,13 (3)	0,89±0,07(4)
Set	3,14±0,19(4)	16,54±7,70(3)	0,73±0,04(3)	0,85±0,03(4)
Out	2,35±0,48(4)	52,65±13,64(4)*	1,49±0,09(3)*	1,25±0,13(3)*
Nov	3,76±0,84(3)	10,30±3,83(4)	0,76±0,04(3)	1,17±0,06(4)
Dez	3,03±0,26(4)	11,86±2,18(5)	0,76±0,08(4)	1,13±0,10(3)
Ano	3,21±0,21 (49)	12,81±2,14(53)	0,66±0,05(42)	0,81±0,04 (43)
p valor	0,00		0,00	

Valores apresentados em média±erro padrão da média (n). p valor referente à análise de variância em nível de 5% de significância. * Indicam as médias significativamente maiores pelo teste de Tukey.

Desenvolvimento ovariano

As fêmeas permaneceram imaturas ao longo de todo o período experimental e com 48 meses de idade (dezembro de 2014) não havia sinais de alteração de fase. Contudo, alguns indícios quanto ao início do desenvolvimento gonadal puderam ser observados.

Na observação macroscópica não havia evidência de ovócitos desenvolvidos e os ovários eram pequenos, pouco volumosos e transparentes. Ao longo dos meses avaliados o órgão foi adquirindo aspecto túrgido e já ocupava uma parte maior da cavidade abdominal (Figura 15), características que foram refletidas através do IGS, especialmente a partir do mês de novembro de 2013, em que os valores começaram a subir, chegando ao pico em dezembro de 2014 quando as coletas foram encerradas (Tabela 4).

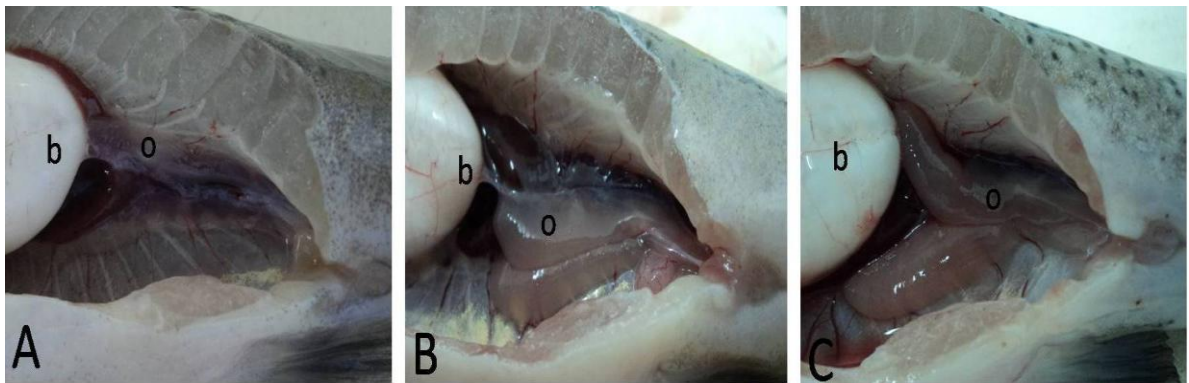


Figura 15: Localização anatômica e aspectos macroscópicos dos **ovários imaturos** de surubim do Iguçu (b= bexiga natatória; o= ovários). A) ovários transparentes, flácidos e ocupando parte pequena da cavidade abdominal (abril de 2012). B) Ovários maiores e com flacidez reduzida (julho de 2013). C) ovário mais evidente, opaco, túrgido e ocupando uma parte maior da cavidade abdominal da fêmea (junho de 2014).

Na avaliação microscópica, as fêmeas apresentaram, ao longo de todo o período, uma abundância de ovogônias e ovócitos em crescimento distribuídos por todo o órgão. Os núcleos eram evidentes, bem como os nucléolos localizados perifericamente (Figura 16). A partir do mês de outubro foi observado um aumento no volume celular dos ovócitos em crescimento primário (Figura 16B), mas sem qualquer evidência de acúmulo de vitelo, confirmando a fase “~~imatura~~” das

fêmeas ao longo dos meses avaliados, mas revelando uma gradual, lenta e clara evolução das fêmeas ao longo do tempo. Evolução que pode ser acompanhada não só pelo aumento do volume celular, mas também pela queda gradual da basofilia e um aumento e dispersão de —estas” do citoplasma dos ovócitos.

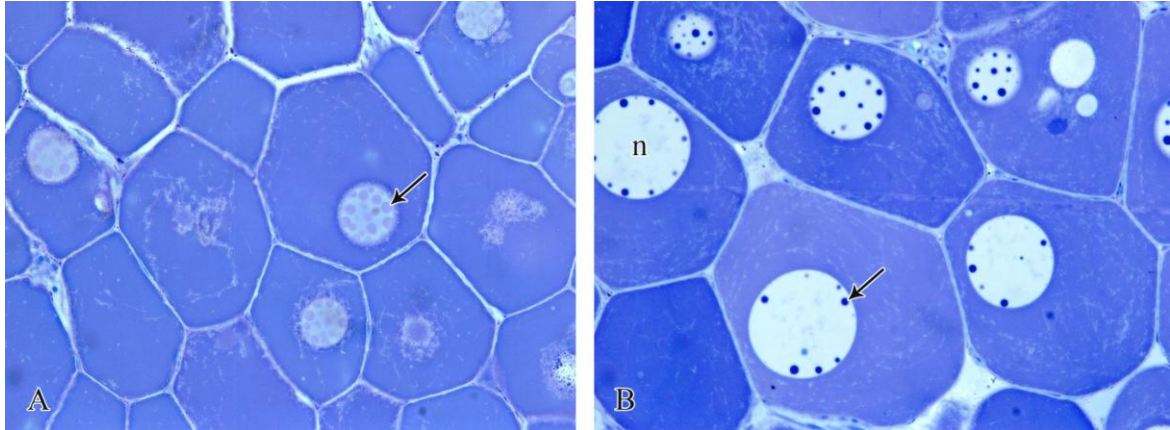


Figura 16: Ovócitos de fêmeas imaturas. A: Fêmea capturada em fevereiro 2012; B: Fêmea capturada em setembro 2013. Notar aumento de tamanho dos ovócitos e diferença na coloração (azul menos intenso) naquele mais desenvolvidos. Observar nos nucléolos (→) a diferença no grau de compactação e na distribuição destes no núcleo (n), que se apresentam mais compactos e periféricos em B. Coloração em Azul de Toluidina e aumento de 400x.

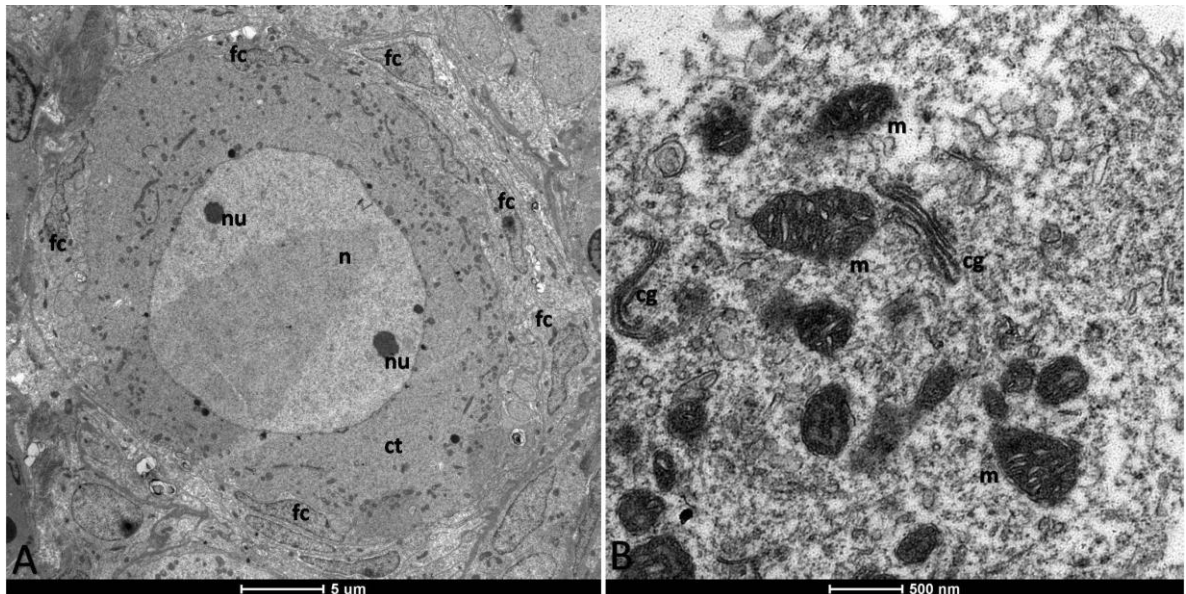


Figura 17: Ovócito em crescimento primário. A) Ovócito circundado pelas células foliculares (fc). n= núcleo, nu= nucléolo, ct= citoplasma. B) Presença de organelas membranosas pelo citoplasma (ct) como mitocôndrias (m) e complexo de Golgi (cg).

Histomorfometria

Além das alterações macroscópicas, observaram-se alterações nos ovócitos que apresentaram mudanças de coloração e tamanho. As alterações na cor se dão pelas mudanças intracelulares de acúmulo de organelas, por exemplo. O tamanho dos ovócitos sofreu um aumento gradual da área e do perímetro da circunferência das células (Tabela 6; Figura 18).

Tais alterações nos ovários foram refletidas sobre os valores do IGS, que aumentaram ao longo do tempo ($p>0,05$), e acompanharam o crescimento dos ovócitos.

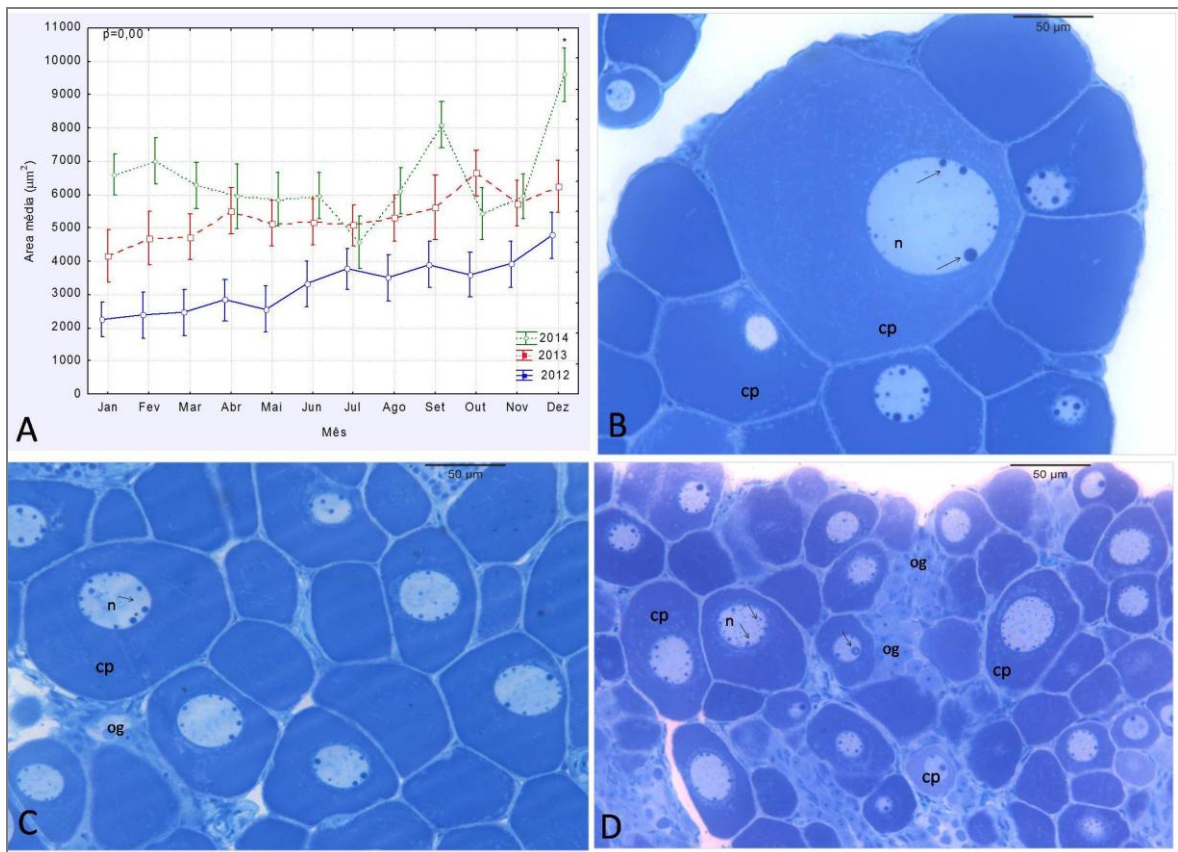


Tabela 6: Análise morfométrica dos folículos ovarianos de fêmeas imaturas de surubim do Iguaçu

Ano	Mês	Área média (μm^2)	Perímetro médio (μm)
2012	Jan	2252,40±147,73(7)	196,35±5,23(7)
2012	Fev	2388,64±135,63(4)	206,32±5,86(4)
2012	Mar	2465,64±64,69(4)	206,46±3,69(4)
2012	Abr	2841,48±123,32(5)	225,09±4,13(5)
2012	Mai	2556,03±92,55(4)	214,21±3,26(4)
2012	Jun	3324,31±76,05(4)	240,04±3,70(4)
2012	Jul	3763,96±232,01(5)	251,61±8,85(5)
2012	Ago	3515,06±174,11(4)	225,57±60,6(4)
2012	Set	3900,21±217,34(4)	235,09±6,61(4)
2012	Out	3590,66±294,68(4)	228,84±6,2(4)
2012	Nov	3923,99±183,57(4)	237,89±7,20(4)
2012	Dez	4779,80±106,56(4)	269,43±3,91(4)
2013	Jan	4156,07±123,70(3)	265,13±3,10(3)
2013	Fev	4691,95±390,65(3)	275,07±11,22(3)
2013	Mar	4730,33±109,16(4)	273,86±4,80(4)
2013	Abr	5512,78±100,30(4)	286,98±9,53(4)
2013	Mai	5131,42±144,10(4)	275,49±4,48(4)
2013	Jun	5184,47±193,59(4)	291,67±3,07(4)
2013	Jul	5087,51±314,30(5)	282,73±9,27(5)
2013	Ago	5306,21±424,10(4)	293,88±11,73(4)
2013	Set	5605,19±113,38(2)	300,15±7,05(2)
2013	Out	6651,63±270,50(4)	321,19±5,12(4)
2013	Nov	5741,78±710,02(4)	302,14±17,89(4)
2013	Dez	6244,54±126,78(3)	310,87±3,26(3)

2014	Jan	6606,73±278,00(5)	329,29±6,35(5)
2014	Fev	7003,19±208,47(4)	331,59±6,14(4)
2014	Mar	6279,90±663,39(4)	314,56±19,40(4)
2014	Abr	5955,43±445,27(2)	293,52±7,33(2)
2014	Mai	5848,98±367,93(3)	289,34±12,06(3)
2014	Jun	5963,42±643,34(4)	300,05±16,84(4)
2014	Jul	4573,98±171,86(3)	269,84±8,45(3)
2014	Ago	6111,66±555,79(4)	296,84±14,94(4)
2014	Set	8103,29±299,03(4)	343,42±7,94(4)
2014	Out	5424,72±461,27(3)	293,43±10,59(3)
2014	Nov	5951,22±318,11(4)	302,49±6,59(4)
2014	Dez	9605,64±1223,42(3)*	362,73±23,71(3)*
Média anual 2012		3218,33±113,20(53)	226,67±3,21(53)
Média anual 2013		5340,00±131,55(44)	289,73±3,33(44)
Média anual 2014		6487,33±223,05(43)	312,45±4,92(43)
p valor (mês)		0,00	0,00

Valores apresentados em média±erro padrão (n). Valores de p referentes à análise de variância * Indicam as médias significativamente maiores pelo teste de Tukey.

Tabela 7: Valores médios mensais de área e perímetro mínimos e máximos, de folículos ovarianos de fêmeas imaturas de surubim do Iguaçu, criadas em cativeiro

Ano	Mês	Área máxima mensal (μm^2)	Perímetro máximo mensal (μm)	Área mínima mensal (μm^2)	Perímetro mínimo mensal (μm)
2012	Jan	7243,45±798,08 (7)	352,73±14,07 (7)	788,38±41,68 (7)	112,58±4,89 (7)
2012	Fev	5217,02±441,98(4)	318,96±10,98 (4)	1026,39±124,04 (4)	135,0±6,51 (4)
2012	Mar	7801,71±1076,24 (4)	359,03±28,41 (4)	908,78±58,81 (4)	125,15±2,86 (4)
2012	Abr	5917,34±355,50 (4)	330,88±14,48 (4)	774,75±65,61 (5)	121,0±6,26 (5)
2012	Mai	6041,23±266,45 (4)	331,84±9,34 (4)	884,21±108,22 (4)	124,32±6,97 (4)
2012	Jun	7290,73±332,92 (4)	358,98±8,72 (4)	976,06±77,85 (4)	127,49±5,94 (4)
2012	Jul	9745,39±1437,36 (5)	391,36±14,40 (4)	1274,70±93,19 (4)	138,79±11,06 (5)
2012	Ago	9263,02±823,84 (4)	400,48±21,62 (4)	776,31±67,11 (4)	111,20±5,81(4)
2012	Set	8924,99±903,05 (4)	378,47±15,11 (4)	1149,94±150,57 (4)	123,94±7,34 (4)
2012	Out	8891,35±890,98 (4)	506,98±126,90 (4)	975,26±119,98 (4)	114,34±8,20 (4)
2012	Nov	10023,35±1282,5 (4)	389,09±27,50 (4)	623,44±178,32 (4)	107,16±5,65 (4)
2012	Dez	13806,81±2013,55 (4)	586,79±116,67 (4)	923,10±104,91 (4)	118,89±8,36 (4)
2013	Jan	9060,19±70,89 (3)	575,42±168,51 (3)	759,48±102,08 (3)	113,69±8,02 (3)
2013	Fev	16083,66±2420,34 (3)	522,56±43,09 (3)	813,91±117,35 (3)	116,49±6,23 (3)
2013	Mar	13505,09±1138,75 (4)	566,99±111,14 (4)	805,75±90,18 (4)	54955±4,42 (4)
2013	Abr	13962,37±942,17 (4)	484,58±23,38 (4)	1024,59±147,36 (4)	125,69±10,0 (4)
2013	Mai	16677,99±1231,45 (4)	519,89±23,03 (4)	962,11±81,64 (4)	117,65±5,01 (4)
2013	Jun	13084,29±342,50 (4)	469,35±8,67 (4)	1222,43±63,73 (4)	138,96±5,35 (4)

2013	Jul	14990,58±989,83 (5)	506,47±14,35 (5)	898,04±120,88 (4)	115,62±6,00 (5)
2013	Ago	14191,31±725,52 (4)	510,05±24,15 (4)	1382,88±82,36 (4)	141,40±8,37 (4)
2013	Set	17706,04±749,51 (2)	567,72±7,23 (2)	1938,39±240,08 (2)*	177,65±14,28 (2)*
2013	Out	21908,44±2762,2 (4)	590,83±31,99 (4)	1845,42±287,54 (4)	154,78±10,98 (4)
2013	Nov	18198,32±4287,63 (4)	554,71±51,44 (4)	972,39±59,70 (4)	117,69±6,05 (4)
2013	Dez	18862,24±758,86 (3)	556,20±13,84 (3)	891,05±160,20 (3)	118,18±9,06 (3)
2014	Jan	15318,36±1203,40 (4)	637,87±51,14 (5)	1095,25±173,02 (5)	138,24±11,76 (5)
2014	Fev	39340,01±23971,92 (4)	545,48±30,71 (4)	1207,66±163,14 (4)	143,18±10,57 (4)
2014	Mar	22602,19±3252,47 (4)	630,81±49,33 (4)	689,96±63,93 (4)	108,01±5,14 (4)
2014	Abr	17856,91±3655,76 (2)	510,25±20,37 (2)	846,16±162,33 (2)	106,96±1,82 (2)
2014	Mai	22368,69±2501,65 (3)	630,51±47,88 (3)	891,17±130,70 (3)	116,62±9,07 (3)
2014	Jun	17828,99±1165,80 (4)	667,89±90,58 (4)	785,84±46,87 (4)	108,60±3,36 (4)
2014	Jul	12303,71±1733,11 (3)	630,73±169,26 (3)	877,18±321,78 (3)	116,95±23,87 (3)
2014	Ago	23384,17±4120,05 (4)	597,38±54,67 (4)	1152,24±194,67 (4)	134,62±14,35(4)
2014	Set	24945,16±1516,4 (4)	678,20±38,70 (4)	1099,01±127,64 (4)	130,86±7,59 (4)
2014	Out	17464,38±2770,13 (3)	760,95±144,25 (3)	598,69±95,82 (3)	102,88±8,08 (3)
2014	Nov	20228,88±4829,89 (4)	840,78±94,75 (4)*	876,16±58,40 (4)	117,25±5,06 (4)
2014	Dez	47083,45±12766,47(3)*	837,27±126,48 (3)	818,44±113,64 (3)	110,39±5,49 (3)
Média 2012		8310,41±401,81(52)	389,82±16,28(51)	912,79±34,54 (52)	121,45±2,21 (53)
Média 2013		15647,60±669,32(44)	532,18±15,62(44)	1109,87±64,84 (43)	127,71±3,23 (44)
Média 2014		23522,99±2678,02(42)	665,82±25,12(43)	929,50±47,47 (43)	121,30±3,35 (43)
p valor (mês)		0,00	0,00	0,00	0,00

Valores apresentados em média±erro padrão (n). Valores de p referentes à análise de variância com 5% de significância * Indicam as médias significativamente maiores pelo teste de Tukey.

Eventos isolados

Algumas exceções aos padrões de desenvolvimento encontrados na população de estudo puderam ser observados. Estas serão relatadas na sequência, a título de informação complementar e, para registro de sua ocorrência.

Gônadas com desenvolvimento irregular

Foi verificado o desenvolvimento irregular das gônadas de 02 fêmeas, nas quais um dos ovários se desenvolveu e o outro não (Figura 19). Relevante é o fato de o peso do órgão não apresentar grande variação, quando comparado às fêmeas do mesmo mês, mantendo o IGS em regularidade com os demais indivíduos, o que indica crescimento compensatório no ovário desenvolvido. Para os machos este evento não foi verificado.

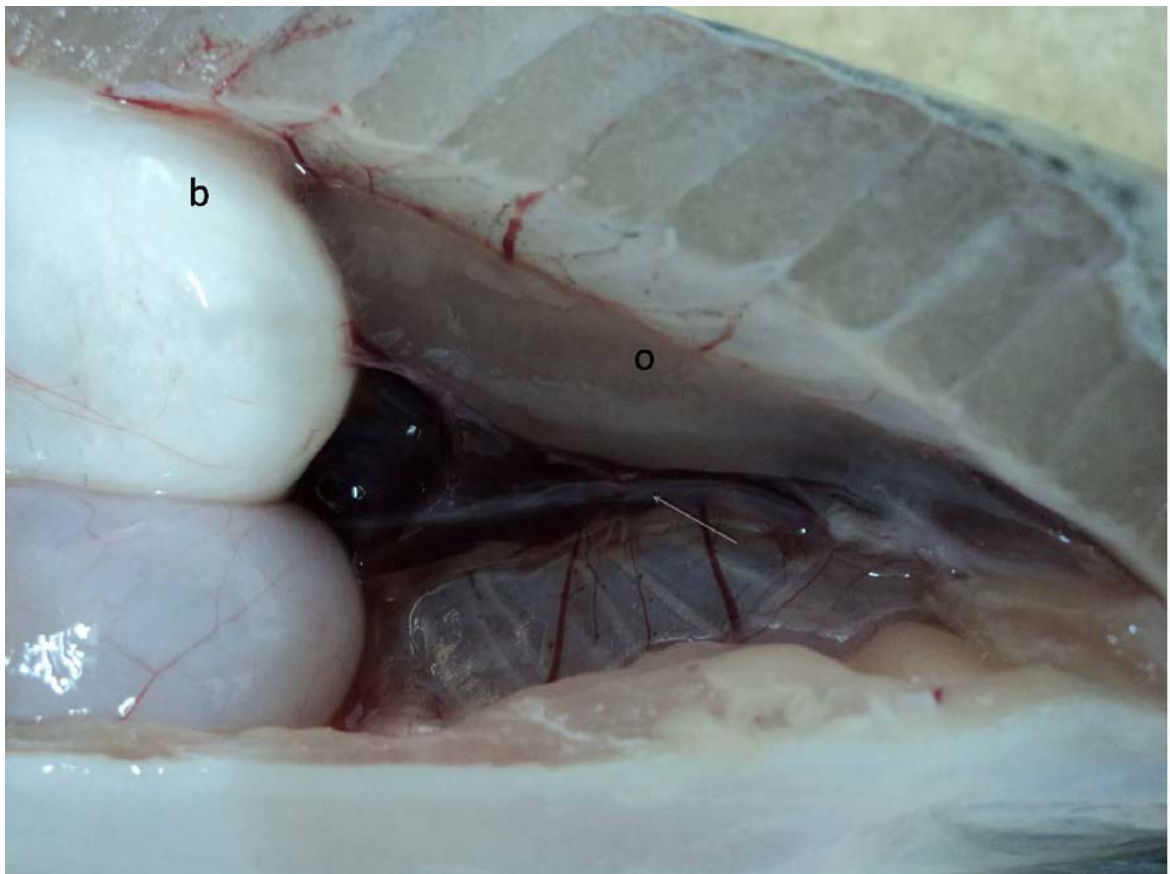


Figura 19: Ovário com crescimento irregular. b= bexiga natatória; o= ovário desenvolvido; →ovário não desenvolvido.

Ocorrência de ovócitos vitelogênicos

Apesar de o aumento do ovário (até mesmo dos ovócitos) ser evidente, não foram observados ovócitos em vitelogênese. Contudo, uma fêmea, coletada em outubro de 2014 (46 meses de idade), apresentou 03 ovócitos vitelogênicos (Figura 20), que estavam destoantes dos demais e podem representar os primeiros ovócitos diferenciados. Estes ovócitos possuíam, do maior para o menor: 717.722,200 μm^2 , 455.357,5 μm^2 e 194.716,1 μm^2 de área, ou seja, 0,71mm, 0,46mm e 0,2mm. Para o perímetro, os valores foram de 3.585,39 μm , 2.835,9 μm e 1.805,4 μm .

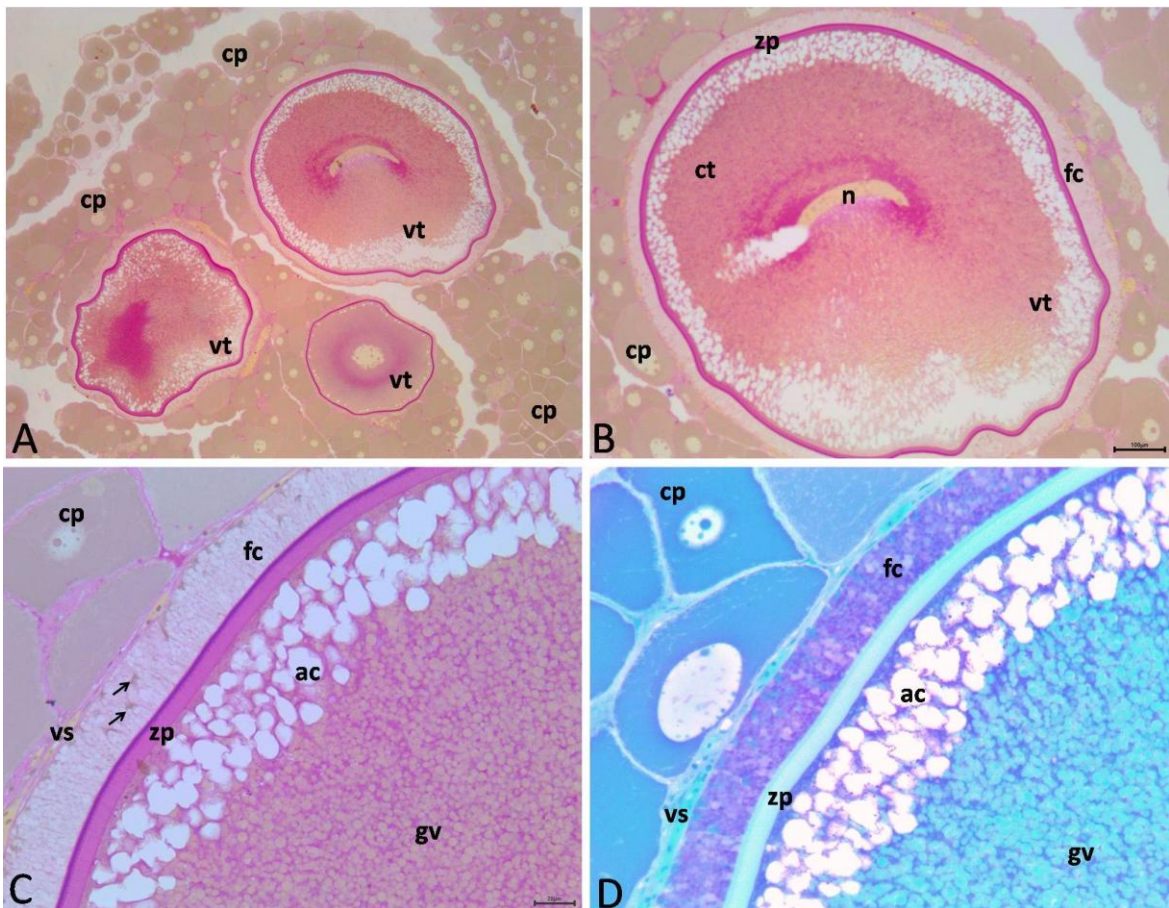


Figura 20: Aspecto dos ovócitos vitelogênicos de surubim do Iguaçú. A) Diferença no tamanho dos ovócitos vitelogênicos (vt) quando comparados aos em crescimento primário (cp) (4x); B) Ovócito vitelogênico (n= núcleo, ct= citoplasma, fc= camada de células foliculares zp= zona pelúcida), aumento de 10x; C) Detalhes dos ovócitos vitelogênicos. Coloração em *metanyl yellow* (100x). Reparar a organização do vitelo em grânulos (gv), presença de alvéolos corticais (ac) próximos a zona pelúcida (zp), e à camada de células foliculares (fc) que apresentam-se espessas. (→= núcleo da célula folicular; vs= vaso sanguíneo); D) idem C, mas em coloração de azul de toluidina.

Indivíduo em intersexo

Entre os eventos isolados, verificou-se a ocorrência de um indivíduo em intersexo. O animal em questão apresentava características macroscópicas de machos, mas em meio às células germinativas masculinas, foram verificados ovócitos em crescimento primário (Figura 21).

Para excluir a hipótese de contaminação da amostra, foi utilizada a técnica de reticulina, a qual permitiu a observação da membrana basal (evidenciada na técnica como uma linha marrom escura) tanto em cistos de espermatogônias, quanto em torno dos ovócitos.

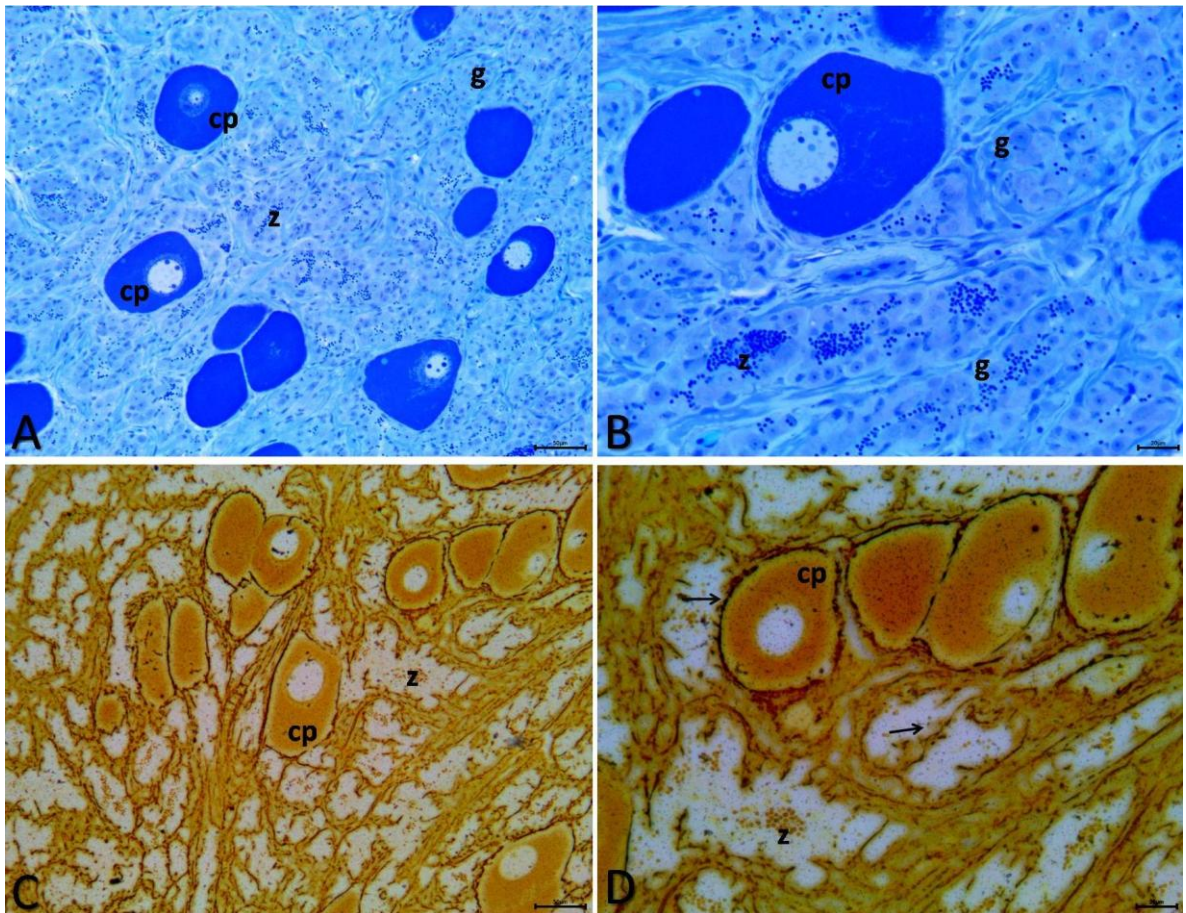


Figura 21: Presença de ovócitos em gônada masculina. A e C) aspecto geral da gônada (20x). B e D) detalhe das células germinativas (40x). Observar o contorno da membrana basal (→) rica em colágeno, marcada como linhas delimitando ovócitos e cistos. (cp= ovócitos em crescimento primário; z= espermatozoides; g= espermatogônias). A e B coloração em azul de toluidina; C e D marcação com reticulina.

Discussão

Os animais apresentaram crescimento e ganho de peso ao longo de todo o período. A modificação de forma crescente destes parâmetros figura como um aspecto relevante, em especial quando se considera a influência do processo de domesticação, que inclui a adequação ao consumo de alimento inerte e o manejo mensal (redes de arrasto) no qual os animais foram submetidos (Zaniboni-Filho e Nuner, 2004). Os dados coletados na população em estudo apresentaram variação individual e em alguns meses os animais selecionados apresentaram maior discrepância de peso e comprimento em relação aos outros meses avaliados, o que se atribui ao fato de a seleção ser aleatória. Contudo, é válido citar que tal variação não interferiu nos padrões reprodutivos, tampouco nas análises estatísticas utilizadas.

A distinção de machos e fêmeas exige experiência do observador, o que dificulta a seleção dos animais. A identificação só é facilitada nos períodos em que os machos estão aptos a espermiar, quando a papila fica mais alongada e intumescida, destacando o orifício de saída do ducto espermático. Em outras fases, contudo, torna-se semelhante à das fêmeas, exigindo maior atenção no momento da seleção.

Esta dificuldade na seleção foi um dos fatores que alteraram o tamanho das amostras ao longo dos meses, pois foram selecionados pelo menos 4 animais de cada sexo, sendo verdadeiro que em alguns meses, foi necessária a eutanásia de mais animais. O tamanho da amostra, também ficou alterada, devido à presença de *outliers*, que foram removidos da análise estatística, gerando —*n* maior ou menor que 4, que era o número de amostras propostas.

Apesar de as fêmeas apresentarem médias de comprimento e peso corporal superiores a dos machos, esta diferença é pequena e exclui qualquer possibilidade de seleção por tamanho, nesta espécie. Tal semelhança corporal foi observada também em estudo de desempenho zootécnico com *Steindachneridion scripta*, no qual diferença de tamanho e rendimento corporal entre machos e fêmeas não foi verificada (Maghelly *et al.*, 2014).

Com relação aos parâmetros reprodutivos, as características macroscópicas das gônadas são similares as descrições disponíveis para outras espécies da família (Pimelodidae) (Batlouni *et al.*, 2006; Honji *et al.*, 2013), e são compostas de órgãos pares localizados próximos aos rins. Os ovários são alongados, cilíndricos e se fundem na porção caudal formando um ducto que termina na papila urogenital. Os testículos, também se unem em um ducto comum com saída para o exterior, pela papila urogenital.

Os testículos também são alongados, mas apresentam aspecto irregular, especialmente no período reprodutivo, quando o volume do testículo aumenta e aparecem —*lobos*” ao longo do órgão, que são um pouco diferentes das —*ranjas*” encontradas em outras espécies, tais como *Pimelodus maculatus*, *Iheringichthys labrosus*, *Conorhyncus conirostris* (Cruz e Santos, 2004) e *Pimelodus britskii* (Damasceno, 2014), mas que também foi observada por Sary (2014) em surubins do Iguaçu adultos.

As modificações de aspecto e volume das gônadas refletem-se sobre o índice gonadossomático, que é dado pela relação entre o peso da gônada e o peso do animal (Vazzoler, 1996) e é um importante indicativo de atividade reprodutiva nos peixes (Tyler e Sumpter, 1996; Romagosa, 2010). Nos machos, como o esperado, o desenvolvimento dos testículos foi proporcional ao aumento do IGS e foram observados picos e quedas nos valores do índice, indicando claramente os períodos de aptidão reprodutiva nos machos. Para as fêmeas, as variações nos valores do IGS acompanharam o desenvolvimento corporal e o crescimento dos ovócitos. Ambos os parâmetros aumentaram gradativamente ao longo dos meses, o que se deve ao fato de as fêmeas permanecerem imaturas, pois em fêmeas em ciclo alterações maiores do índice seriam esperadas.

Em relação à flutuação dos esteroides, sabe-se que estes variam durante a puberdade e/ou durante o ciclo reprodutivo (Schulz e Nóbrega, 2011). Nos peixes, os níveis plasmáticos de testosterona nas fêmeas podem ser menores, maiores ou iguais do que o dos machos da mesma espécie (Borg, 1994) e os valores esperados para animais jovens apresentam grande variação e podem ser baixos, podendo atingir valores menores que 1ng/mL em animais imaturos (Larsen *et al.*,

2004), o que não foi o caso nesta população, cujos valores foram superiores a 2ng/mL em todo o período.

Neste estudo, a concentração de testosterona sofreu variação, ao longo do tempo e os maiores valores foram observados nos machos, porém alterações na concentração deste esteroide também foram observadas nas fêmeas.

Para os machos, a variação nos níveis plasmáticos de testosterona foi condizente com as alterações morfológicas. Os andrógenos, como a testosterona, participam de diversos processos relacionados à reprodução dos machos de peixes, como início da puberdade, multiplicação de espermatogônias, espermatogênese, formação de espermatocistos e espermiação (Schulz *et al.*, 2010). Avaliando a flutuação de testosterona, esta parece estar relacionada com a liberação dos espermatozoides (espermiação) nesta espécie, uma vez que os níveis foram altos durante a fase de aptidão reprodutiva. Na sequência dos eventos, a concentração de testosterona caiu de forma significativa pela entrada dos machos na fase de regressão, quando há a redução dos espermatozoides no órgão. Nesta fase acontece a fagocitose dos espermatozoides residuais pelas células de Sertoli (Schulz e Nóbrega, 2011).

Para as fêmeas a concentração média de testosterona foi menor quando comparada aos machos, mas apresentou aumento gradual. Para o bacalhau (*Gadus morhua*) foi observado que os andrógenos, incluindo a testosterona, estão relacionados ao desenvolvimento dos ovócitos pré-vitelogênicos (Kortner *et al.*, 2008; Kortner *et al.*, 2009). Ainda, o tratamento de fêmeas com testosterona, promoveu o crescimento dos folículos ovarianos em fêmeas imaturas de *Anoplopoma fimbri* (Guzmán *et al.*, 2015), de modo que a testosterona parece ter influência sobre os ovócitos antes da fase de vitelogênese, nos peixes. Considerando o que foi observado no período experimental, esta relação entre testosterona e o crescimento inicial dos ovócitos parece se aplicar para as fêmeas de surubim do Iguaçu.

Em relação ao estradiol, este é mencionado como estimulante à mitose (proliferação) nas espermatogônias (Schulz e Miura, 2002; Schulz *et al.*, 2010). Apesar de ser relacionado à proliferação, nos machos desta espécie o pico de estradiol aconteceu quando estes estavam na fase de aptidão reprodutiva e não

de regeneração, como seria o esperado (já que é nesta fase que acontece o repovoamento do testículo). O que sugere que outras funções podem ser executadas pelo estradiol na dinâmica reprodutiva dos peixes.

Para mamíferos, algumas outras funções dos estrógenos nos machos vêm sendo apontadas, tais como a influência na manutenção do epitélio e na morfologia espermática (Hess, 2003) e sobre as etapas finais de modificação das espermátides para espermatozoides e na motilidade espermática (Carreau *et al.*, 2011).

Sobre os efeitos do estradiol nas fêmeas, está claro que tem efeito sobre o desenvolvimento dos ovócitos (Devlin e Nagahama, 2002) e estimula a produção de vitelogenina (Akhavan *et al.*, 2015). Porém, as fêmeas estudadas não chegaram a iniciar a vitelogênese, para que a relação do esteroide com o acúmulo de nutrientes pudesse ser confirmada.

Mesmo que a variação dos esteroides não tenham refletido claramente sobre o desenvolvimento reprodutivo das fêmeas, é importante salientar que este grupo de hormônios (esteróides sexuais) está também envolvido com outros aspectos metabólicos. Incluem-se aqui aqueles relacionados com a regulação dos mecanismos de crescimento e atividade metabólica do fígado e dos músculos, eventos que puderam ser observados em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Norbeck e Sheridan, 2011; Cleveland e Weber, 2015).

Quanto ao desenvolvimento das células germinativas, nas fêmeas foi observado o aumento de “estrias” ou “anhuras” nos ovócitos, estas são decorrentes da multiplicação e dispersão das organelas membranosas, que são indicadores da alta atividade metabólica dos ovócitos no seu preparo para sua posterior entrada em vitelogênese (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2013; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2014). Mesmo com todas estas alterações, e consequente incremento no tamanho dos ovócitos, não houve nenhuma indicação de entrada das fêmeas na fase de desenvolvimento. Tal mudança de fase seria detectada pela visualização dos primeiros alvéolos corticais, seguida de ovócitos em início de vitelogênese (Brown-Peterson *et al.*, 2011), o que não aconteceu no período avaliado.

O aumento aparente dos ovócitos pôde ser evidenciado pela área média e pelo perímetro dos folículos. Entende-se que o folículo é a unidade de desenvolvimento dos gametas femininos que é composto pela célula germinativa (ovócito) e pela camada de células foliculares, ou da granulosa, que estão apoiadas em uma membrana basal e envoltas perifericamente por células da teca (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011; Reading e Sullivan, 2011). Nas lâminas fotografadas, e utilizadas para a morfometria, a membrana basal e a camada da teca não puderam ser facilmente definidas. Mesmo assim, o contorno dos folículos estava claro, o que permitiu a realização das medições e a confirmação do crescimento dos ovócitos pré-vitelogênicos.

Apesar de o diâmetro celular ser um parâmetro mais utilizado, nos peixes, é aferido em ovócitos extrusados (Romagosa *et al.*, 2001), e as células que dispomos são de crescimento primário e seu formato na lâmina é muito irregular, por isso, optamos pela utilização da área média e do perímetro do folículo (contorno folicular), por que acreditamos serem parâmetros válidos, considerando o plano bidimensional das imagens microscópicas. Além disso, utilizando as imagens podemos aumentar a amostragem em cada fêmea e promover a obtenção de médias mais representativas.

Enquanto isto, nos machos a espermatogênese foi correspondente a sequencia de eventos conhecidos, no qual espermátogônias são envoltas por células de Sertoli, que formam cistos nos quais acontecem os processos de multiplicação e diferenciação das células germinativas até a abertura destes cistos e liberação dos espermatozoides (revisão em Schulz *et al.*, 2010). Todas estas etapas puderam ser vistas claramente ao longo do desenvolvimento dos testículos e permitiram a diferenciação das fases reprodutivas (Brown-Peterson *et al.*, 2011).

Mesmo que todas as fases tenham sido observadas, a fase de desenvolvimento estendeu-se ao longo de muitos meses, o que pode ser justificado pelo padrão de reprodução sazonal da maioria dos peixes de água doce, no Brasil (Godinho *et al.*, 2010) que é observado em outras espécies da família (Pimelodidae), como *Pimelodus maculatus* (Wildner *et al.*, 2013) *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Resende *et al.*,

1995) e *Steindachneridion parahybae* (Canepelle *et al.*, 2009). Neste molde de reprodução, o intervalo entre uma reprodução (ou aptidão reprodutiva) e outra costuma ser longo. Parece ser este o caso do surubim do Iguçu.

Ainda sobre os machos, antes de entrarem em ciclo reprodutivo, foi verificada a ocorrência de uma “primeira onda espermatogênica”, evento bastante estudado em mamíferos (O’Shaughnessy, 2014), que também foi registrado em peixes (Schulz *et al.*, 1997; Schulz e Goss, 1999). A observação dos testículos dos machos experimentais juntamente com as amostras obtidas de machos mais jovens (segunda população) promoveu evidências da formação de alguns espermatozoides antes dos animais entrarem em desenvolvimento, que é a fase em que a diferenciação destes gametas acontece em grande quantidade. Podemos supor que essa primeira onda aconteça a partir da formação da barreira hemato-testicular, ocorrência que assegura as condições favoráveis para o desenvolvimento dos gametas finais (Batlouni *et al.*, 2009). Os espermatozoides puderam ser observados e o evento registrado para a espécie, contudo se estas células iniciais são mantidas ou reabsorvidas é uma informação que não podemos concluir com base nos dados disponíveis. Ainda, as características histológicas associadas a este evento são semelhantes à fase de regeneração (Brown-Peterson *et al.*, 2011), por isso tais informações devem estar aliadas ao aspecto macroscópico da gônada para evitar interpretações equivocadas, especialmente naqueles animais em que a idade não é conhecida.

Os machos provenientes da segunda população de animais entraram na fase de desenvolvimento com 11 meses de idade (setembro), o que aconteceu meses antes daqueles utilizados nas coletas regulares (imaturos até 16 meses). Isto se deve provavelmente a diferenças nas condições de criação ou mesmo as características da água, pois nesta estação o abastecimento dos tanques de criação vem diretamente do rio Iguçu, que é o habitat natural da espécie. Além disto, este segundo lote não sofreu com o estresse mensal de manipulação de redes de arrasto no tanque, como aqueles animais do lote regular. Apesar da diferença temporal, a aparência das gônadas e a sequência dos eventos observados foram as mesmas nos dois lotes avaliados.

Independente da idade dos machos, o fato destes tornarem-se aptos a espermiar, confirma a passagem destes animais na puberdade. Esta é uma etapa complexa do desenvolvimento, que promove o aparecimento de características sexuais secundárias e marca o intervalo entre as fases não reprodutivas e reprodutivas do ciclo de vida nos animais (Ozen *et al.*, 2014). Nos peixes, compreende um conjunto de processos nos quais animais imaturos adquirem a capacidade de reproduzir (Okusawa, 2002), e nos machos pode ser caracterizada pelo início da espermatogênese (Schulz e Goss, 1999).

As etapas que levam a formação dos espermatozoides puderam ser visualizadas na microscopia de luz, pela diferença nos cistos. Quando verificada em microscopia eletrônica, a morfologia da célula obedece aos padrões que costumam ser observados em outros Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Oliveira, 2008), com exceção à presença de fossa nuclear, que foi observada no espermatozoide de surubim e cuja ausência é relatada em outras espécies da família (Burns *et al.*, 2009).

Com relação às avaliações de sêmen, mesmo se tratando de animais diferentes, os machos que foram manipulados reprodutivamente apresentaram melhor resposta ao tratamento e maior motilidade espermática, nos mesmos meses em que as concentrações hormonais aferidas na população foram aumentadas, no caso em setembro e outubro.

Para determinar a qualidade do sêmen, a motilidade costuma ser o parâmetro mais utilizado (Alavi e Cosson, 2005), entretanto outros parâmetros poder ser avaliados em conjunto. Empregando as mesmas técnicas descritas, os dados médios de volume seminal, normalidade e motilidade verificados por Marcos (2012) em machos adultos de surubim do Iguaçu, foram de 11,74±5,38 mL de sêmen, 75,81±5,71% de espermatozoides normais e 99,86±0,31% de espermatozoides móveis, o que é superior aos verificados neste trabalho, mesmo quando comparados aos picos de cada variável (525±170,17 µL, 91,21±1,83% de células móveis e 70,98±3,96 de espermatozoides normais). Com relação à normalidade espermática, este consiste em um procedimento que pode ser considerado agressivo. Mesmo sem fazer esfregaço, é possível que a soma dos processos de extrusão, fixação e coloração acarretem em danos aos

espermatozoides, que por estarem livres sofrem diretamente todas as agressões, o que pode justificar os percentuais de normalidade baixos e incompatíveis com a motilidade.

Mesmo considerados aptos a reproduzir, os machos púberes, liberaram pequeno volume de sêmen e apresentaram médias de normalidade e motilidade inferior àquela observada nos indivíduos em atividade reprodutiva. A idade dos reprodutores parece afetar a qualidade do sêmen, sendo que animais muito jovens ou muito velhos, apresentam qualidade inferior aos adultos de idade média (Rurangwa *et al.*, 2004), mas estas relações ainda são pouco exploradas. Além disso, as maiores variações de produção (e qualidade de sêmen) acontecem em função do ciclo reprodutivo de cada espécie (De Souza *et al.*, 2015), aspecto que ficou claro neste ensaio, quando os animais passaram períodos sem que houvesse produção e, conseqüente, liberação de sêmen.

Apesar de todos estes eventos é válido citar que somente a capacidade reprodutiva não implica necessariamente na reprodução. Sabe-se que fatores externos são necessários para estimular o comportamento reprodutivo (Stacey, 2003), sendo que mesmo os animais aptos a reproduzir, não necessariamente realizam reprodução (Munakata e Kobayashi, 2010).

Os testículos apresentaram-se mais desenvolvidos, ao mesmo tempo em que os níveis de ambos esteróides avaliados foram crescendo, confirmando a íntima relação das flutuações hormonais e os processos reprodutivos (Miura e Miura, 2003; Munakata e Kobayashi, 2010). Assim, esta relação entre as fases, o índice gonadossomático e a concentração de esteróides faz com que este parâmetro possa ser utilizado para averiguar a aptidão reprodutiva dos machos sem a necessidade de sacrifício do animal.

Nas fêmeas, os valores de estradiol acompanharam a flutuação da testosterona, o que pode ser explicado pelo fato de, nos vertebrados, os estrógenos, incluindo o estradiol, serem provenientes da aromatização dos andrógenos (Carreau *et al.*, 2011). Os picos acompanharam o padrão dos machos, o que pode sinalizar o período ideal para reprodução da espécie, uma vez que, parece haver sincronia entre os eventos de machos e fêmeas, mesmo que nestas as modificações aconteçam de maneira mais lenta. Além disso, os

esteróides (especialmente testosterona) estão relacionados ao comportamento reprodutivo dos peixes (Katsiadaki e Sebire, 2011) fazendo com que a flutuação semelhante se justifique.

Por estarmos habituados a relacionar altos níveis de estrógenos para fêmeas e andrógenos para machos, as concentrações semelhantes podem parecer incompatíveis com o esperado, mas acontecem com frequência nos peixes, pois estes possuem uma grande plasticidade sexual quando comparados aos demais vertebrados (Coumailleau *et al.*, 2015). Esta plasticidade permite que eventos como masculinização (Bombardelli e Hayashi, 2005; Vizziano *et al.*, 2008; Golan e Levavi-Sivan, 2014), feminilização (Strüssman *et al.*, 1996; Amaral Jr *et al.*, 2008) ou mesmo a diferenciação sexual por temperatura (Baroiller e D'Cotta, 2001; Blazquez e Somoza, 2010), natural ou artificialmente, aconteçam com regularidade.

Com relação aos eventos isolados, estes não representam aspectos de normalidade, mas não são exclusivos. Gônadas de tamanho irregular foram observadas no surubim do Paraíba (Honji *et al.*, 2013), e discrepância do desenvolvimento dos ovócitos e a ocorrência de um indivíduo intersexo pode ter acontecido por sinalizações ou interações endócrinas irregulares, mas de caráter individual.

A observação das características do ovócito vitelogênico mais desenvolvido nos permite algumas considerações. O tamanho da célula aliado aos numerosos glóbulos de vitelo, espessura da camada folicular e abundância de alvéolos corticais nos permite afirmar que ovócito havia completado seu crescimento (*full grown*), além disso, o posicionamento mais lateral do núcleo sugere o início da maturação final (Lubzens *et al.*, 2010). Contudo, devido ao fato da fêmea estar imatura, é possível que este ovócito tornaria-se atrésico.

A área média do maior folículo é cerca de 72 vezes maior que a média mais alta. Quando comparada a média do mês de ocorrência (outubro 2014) o valor é cerca de 130 vezes maior. Relação semelhante acontece com o perímetro, sendo que os maiores valores encontrados nas fêmeas imaturas, são bastante inferiores àqueles verificados nos ovócitos vitelogênicos. O que aponta para um desenvolvimento contínuo e expressivo das células na fase de vitelogênese.

Quanto ao intersexo, afirmamos que não houve contaminação da amostra baseados na resposta positiva à reticulina em torno dos ovócitos. A marcação positiva nesta técnica evidencia a membrana basal e confirma os ovócitos como componentes do órgão. Em caso de contaminação, a membrana basal não apareceria marcada na técnica, uma vez que os ovócitos desprendem-se dos ovários sem as camadas externas, como a camada folicular, camada da teca e a membrana basal, que permanecem no ovário e formam o complexo pós-ovulatório (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011).

Considerações finais

Verificamos que, de modo geral, as informações a respeito de animais imaturos são reduzidas quando comparadas aos adultos, o que abre perspectivas para novas pesquisas que permitam entender os eventos que levam à puberdade e à primeira maturação dos peixes.

Para o surubim do Iguacu, o desenvolvimento gonadal dos machos, criados em cativeiro, se inicia com cerca de um ano idade. Alterações do testículo acontecem em conformidade com as modificações celulares e refletem-se sobre o índice gonadossomático. A concentração de esteroides plasmáticos (testosterona e estradiol) flutua de maneira compatível com estas alterações e pode ser utilizada como índice reprodutivo para os machos. Ainda, os machos desta espécie apresentam um desenvolvimento gonadal mais acelerado do que fêmeas, criadas sob as mesmas condições, que permaneceram imaturas mesmo com 48 meses de idade (4 anos).

Como o período de aptidão reprodutiva foi curto, nossa sugestão é de que os machos iniciaram o acúmulo de espermatozoides no testículo, preparando-se para a reprodução, mas por falta de estímulos externos vindos de fêmeas aptas a reproduzir (para a manutenção da produção e/ou liberação do sêmen) houve a aceleração do processo de regressão gonadal.

Contudo, a confirmação dessas suposições depende da compreensão do ciclo reprodutivo das fêmeas. Estas apresentam desenvolvimento gonadal tardio, mas foi verificado aumento na concentração dos esteróides, do tamanho dos ovócitos e do índice gonadossomático. Vale ressaltar, que os picos dos esteroides acompanharam os picos nos machos, o que pode sinalizar a sincronização de machos e fêmeas, quando o período reprodutivo se iniciar.

Observando o comportamento geral dos dados obtidos, para machos e fêmeas, o período reprodutivo da espécie acontece durante os meses da primavera (setembro a novembro), por isso sugerimos que os protocolos de reprodução artificial sejam conduzidos neste intervalo.

Conclusão

Nas condições do experimento, o primeiro ciclo reprodutivo foi registrado em machos entre um e dois anos de vida. De acordo com as variações do índice gonadossomático, produção de sêmen e flutuação dos esteroides, o período reprodutivo dos machos acontece entre setembro e novembro.

As fêmeas permaneceram imaturas durante o período avaliado, mas a evolução dos parâmetros aponta para uma sincronia dos eventos reprodutivos e período reprodutivo da espécie nos meses de primavera.

Referências Bibliográficas

- Akhavan, S.R., Falahatkar, B., Tolouei Gilani, M.H. & Lokman, P.M. (2015). Effects of estradiol-17 implantation on ovarian growth, sex steroid levels and vitellogenin proxies in previtellogenic sturgeon *Huso huso*. *Animal Reproduction Science*, in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.010>.
- Alavi, S.M.H. & Cosson, J. (2005). Sperm motility in fishes I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* **29**, 101–110.
- Alvarenga, E.R. & França, L.R. (2009). Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Biology of reproduction* **80**, 537–544.
- Amaral Jr, H., Nunes, M.F.S. & Garcia, S. (2008). Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. *Revista eletrônica de Veterinária* **9**.
- Andrade, V.X.L., Honji, R. & Romagosa, E. (2010). Processo de maturação das gônadas de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) alimentado com dois níveis proteicos e suplementados com óleo de milho. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **62**, 332-342.
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y. & Bazzoli, N. (2010). Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Animal Reproduction Science* **118**, 330–336.
- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Carrilo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Navarro, J.C. & Bromage, N. (2001). Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA — enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture* **194**, 173–190.
- Babaei, H., Kheirandish, R. & Ebrahimi, L. (2012). The effects of copper toxicity on histopathological and morphometrical changes of the rat testes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1615-1619.
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Itzes, I., Krieger, M.H. & Lulhier, F. (2001). Steroid profiles in cultured female jundiá, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* **121**, 325-332
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Itzes, I., Krieger, M.H. & Lulhier, F. (2002). Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology* **61**, 751-763.
- Baroiller, J.F., D' Cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **130**, 399-409.

- Batlouni, S.R., Nobrega, R.H. & França, L.R. (2009). Cell junctions in fish seminiferous epithelium. *Fish Physiology and Biochemistry* **35**, 207–217
- Batlouni, S.R., Romagosa, E. & Borella, M.I. (2006). The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium: An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science* **96**, 116–132.
- Bittencourt, F., Feiden, A., Signor, A.A., Boscolo, W.R., Coldebella, A. & Manske, C. (2009). Densidade de estocagem do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) cultivado em tanque-rede no reservatório José Richa. Resumo expandido. Zootec: Águas de Lindóia, SP. Anais do evento.
- Blázquez, M. & Somoza, G.M. (2010). Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology* **166**, 470–477.
- Bombardelli, R.A. & Hayashi, C. (2005). Masculinização de larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com 17 α -Metiltestosterona. *Revista Brasileira de Zootecnia* **34**, 365-372.
- Bombardelli, R.A., Mörschbacher, E.F., Campagnolo, R., Sanches, E.A. & Syperreck, M.A., (2006). Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy&Gaimardm, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**, 1251–1257.
- Borg, B. (1994). Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* **109**, 219-245.
- Brasil, D.F. (2001). Análise estrutural e ultraestrutural da maturação final do ovócito, fertilização e primeira clivagem em curimatá, *Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836. Pós graduação em aquicultura, Centro de Aquicultura da Unesp (tese de doutorado) Jaboticabal, São Paulo.
- Brasil, D.F., Nakaghi, L.S.O., Santos, H.S.L., Quagio Grassiotto, I. & Foresti, F. (2002). Estudo morfológico dos primeiros momentos da fertilização em Curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). *I Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, 733-747, <http://www.civa2002.org>
- Brown-Peterson, N., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J. & Lowerre-Barbieri, S.K. (2011). A Standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management and Ecosystem Science* **3**, 52–70.
- Brown-Peterson, N.F., Grier, H. & Overstreet, R.M. (2002). Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *Journal of Fish Biology* **60**, 178–202.
- Burns, J.R., Quagio-Grassiotto, I., Jamieson, B.G.M. (2009). Ultrastructure of spermatozoa: Ostariophysi. In: Jamieson, B.G.M. *Reproductive biology and phylogeny of fishes: Agnathans and bony fishes*, volume A. Science Publishers.

- Caneppele, D., Honji, R.M., Hilsdorf, A.W.S & Moreira, R.G. (2009). Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, **7**, 759-762.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H. & Delalande, C. (2011). Estrogens - new players in spermatogenesis. *Reproductive Biology* **1**, 174-193.
- Cleveland, B.M & Weber, G.M. (2015). Effects of sex steroids on expression of genes regulating growth-related mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.11.018>
- Colciago, A., Casati, L., Negri-Cesi, P. & Celotti, F. (2015). Learning and memory: Steroids and epigenetics. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **150**, 64–85.
- Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). (2008). Resolução nº 876, de 15-02-2008, publicada no DOU de 25-02-2008. Seção 1, pág. 100.
- Coumailleau, P., Pellegrini, E., Adrio, F., Diotel, N., Cano-Nicolau, J., Nasri, A., Vaillant, C. & Kah, O. (2015). Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians. *Biochimica et Biophysica Acta* **1849**, 152–162
- Cruz, R. J.G & Santos, J.E. (2014). Testicular structure of three species of neotropical freshwater pimelodids (Pisces, Pimelodidae). *Revista brasileira de Zoologia* **21**, 267-271
- Daga, V. S. & Gubiani, E.A. (2012). Variations in the endemic fish assemblage of a global freshwater ecoregion: Associations with introduced species in cascading reservoirs. *Acta Oecologica* **41**, p.95-105.
- Damasceno, D.Z. (2014). *Indução a espermição do mandi-pintado, Pimelodus britskii no período reprodutivo (Teleostei: Pimelodidae)*. Dissertação entregue ao programa de pós graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP).Jaboticabal, SP.
- De Souza, T.G., Hainfellner, P., Kuradomi, R.Y., Muñoz, M.E., Honji, R.M., Moreira, R.G. & Batlouni, S.R. (2015). Inappropriate management conditions, especially for the regressed class, are related to sperm quality in *Prochilodus lineatus*. *Theriogenology* **83**, 797–807.
- Degani, G., Boker, R. & Jackson, K. (1998). Growth hormone, sexual maturity and steroids in male carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **120**, 433–440.
- Devlin, R.H. & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**, 191–364.
- Fagundes, M. (2009). Estudos fisiológicos e metabólicos do estresse de manejo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Programa de pós graduação em aquicultura do centro de aquicultura da UNESP. Jaboticabal- SP, 139p.

- Feiden, A., Hayashi, C. & Boscolo, W.R. (2006). Desenvolvimento de larvas de surubim-do-Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) submetidas a diferentes dietas. *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**, 2203-2210.
- Garavello, J. C. (2005). Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology* **3**, 607 - 623.
- Godinho, A.L., Lamas, I.R., & Godinho, H.P. (2010). Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. *Environment Biology Fish* **87**, 143–162.
- Golan, M. & Levavi-Sivan, B. (2014). Artificial masculinization in tilapia involves androgen receptor activation. *General and Comparative Endocrinology* **207**, 50–55.
- Grier H.J & LoNostro, F. (2000). The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In: Norberg, B.; Kjesbu, O.S.; Taranger, G.L.; Andersson, E.; Stefansson, S.O. editors. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norway: University of Bergen. Proceedings... p.233-236.
- Guzmán, J.M, Luckenbach, J.A., Silva, D.A.M., Ylitalo, G.M. & Swanson, P. (2015). Development of approaches to induce puberty in cultured female sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *General and Comparative Endocrinology*, in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.024>.
- Hafez, E. S. E., Jainudeen, M. R. & Rosnina, E Y. (2004). Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução. In: Hafez, B., Hafez, E.S.E. *Reprodução animal*, 7 ed. Manole.
- Hess, R.A. (2003). Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**.
- Honji, R.M., Caneppele, D. & Moreira, R.G. (2013). Caracterização macroscópica das gônadas durante a reprodução induzida em cativeiro do surubim do Paraíba. *Pesquisa agropecuária Brasileira* **48**, 1110-1114
- Ignacio, D.L., Frankenfeld, T.G.P., Fortunato, R.S., Vaisman, M., Werneck-de-Castro, J.P.S., & Carvalho, D.P. (2009). Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. **53** (online).
- Katsiadaki, I. & Sebire, M. (2011). Sexual behavior in fish. In: Farrel, A.P., Cech Jr., J.J., Richards, J.G. & Stevens, E.D. *Encyclopedia of fish physiology: volume 1*. Academic press, Elsevier.
- Kim, J., Hayton, W.L. & Schultz, I.R. (2006). Modeling the brain–pituitary–gonad axis in salmon. *Marine Environmental Research* **62**, 426–432.
- Kortner, T.M., Rocha, E. & Arukwe, A. (2009). Previtellogenic oocyte growth and transcriptional changes of steroidogenic enzyme genes in immature female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after exposure to the androgens 11-Ketotestosterone and testosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **152**, 304–313.
- Kortner, T.M., Rocha, E., Silva, P., Castro, F.C. & Arukwe, A. (2008). Genomic approach in evaluating the role of androgens on the growth of Atlantic cod

- (*Gadus morhua*) previtellogenic oocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* **3**, 205–218.
- Larsen, D.A., Shimizu, M., Cooper, K.A., Swanson, P. & Dickhoff, W.W. (2004). Androgen effects on plasma GH, IGF-I, and 41-kDa IGFBP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology* **139**, 29–37.
- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E.L., Gómez, A. & Lareyre, J.J. (2010). Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 412–437.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J. & Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and comparative endocrinology* **165**, 367–389.
- Ludwig, L. A. M., Gomes, E. & Artoni, R.F. (2005). Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanodermatum* (Siluriformes, Pimelodidae) do rio Iguaçu. *Publicatio UEPG. Ciências Biológicas e da Saúde* **11**, 23 – 27.
- Maghelly, O.R., Huergo, J.M., Zaniboni Filho, E. & Enke, D.R.S. (2014). Características morfométricas e rendimento corporal do Surubi *Steindachneridion scriptum* agrupados por sexo. *Boletim do Instituto de Pesca* **40**, 419-430
- Marcos, R.M (2012). *Parâmetros seminais e espermáticos, estocagem e criopreservação do sêmen do surubim do Iguaçu, Steindachneridion melanodermatum* (Garavello, 2005). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná.
- Miura, T. & Miura, C.I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish physiology and biochemistry* **28**, 181–186.
- Morais, D.B., Cupertinom M.C. Goulart, L.S., Freitas, K.M., Freitas, M.B.D., Paula, T.A.R. & Matta, S.L.P. (2013). Histomorphometric evaluation of the *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment and indices of sperm production. *Animal Reproduction Science* **140**, 268– 278
- Munakata, A. & Kobayashi, M. (2010). Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 456–468.
- Mylonas, C., Fostier, A. & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 516-534
- Neumann, G.; Bombardelli, R. A.; Sanches, E. A. & Toledo, C. P. R. (2013). *Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre*. Toledo, PR – Brasil. 1º. ed. ISBN: 978-85-603-0840-8.
- Norbeck, L.A. & Sheridan, M.A. (2011). An in vitro model for evaluating peripheral regulation of growth in fish: Effects of 17 β -estradiol and testosterone on the expression of growth hormone receptors, insulin-like growth factors, and

- insulin-like growth factor type 1 receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* **173**, 270–280.
- O'Shaughnessy, P. (2014). Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **29**, 55–65.
- Okuzawa, K. (2002). Puberty in teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 31–41.
- Ozen, S., Goksen, D. & Darcan, S. (2014). Agricultural Pesticides and Precocious Puberty. *Vitamins and Hormones* **94**, 27-40.
- Pereira, M.L., Rodrigues, N.V. & Garcia e Costa, F. (2012). Histomorphological evaluation of mice testis after co-exposure to lead and cadmium. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **1**, 34-37.
- Puchtler H. & Waldrop, F.S. (1978). Silver Impregnation Methods for Reticulum Fibers and Reticulin: A Re-Investigation of Their Origins and Specificity. *Histochemistry* **57**, 177-187.
- Quagio-Grassiotto, I. & Oliveira, C. (2008). Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoologischer Anzeiger* **247**, 55–66.
- Quagio-Grassiotto, I., Gameiro, M.C., Schneider, T., Malabarba, L.R. & Oliveira, C. (2003). Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the Curimatidae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the Characiformes. *Neotropical Ichthyology* **1**, 35-45.
- Quagio-Grassiotto, I., Wildner, D.D. & Guimarães-Bassoli, A.C.D. (2014). A cytochemical approach to describe oocyte development in the freshwater Ostariophysan *Serrasalmus maculatus* (Characiformes). *Micron* **60**, 18-28.
- Quagio-Grassiotto, I., Wildner, D.D. & Ishiba, R. (2013). Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **37**, 181-191.
- Quagio-Grassiotto, I., Grier, H., Mazzoni, T.S., Nobrega, R.H. & Amorim, J.P. (2011). 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* **272**, 1290–1306.
- Quagio-Grassiotto, I., Spadella, M.A., Carvalho, M. & Oliveira, C. (2005). Comparative description and discussion of spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in some species of Heptapteridae and Pseudopimelodidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*, **3**, 401-410.
- Quintero-Hunter I, Grier H. J. & Muscato, M. (1991). Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotechnic & Histochemistry* **66**, 169-172.

- Reading, B.J & Sullivan, C.V. (2011). Vitellogenesis in fishes. In: Farrel, A.P., Cech Jr., J.J., Richards, J.G. & Stevens, E.D. *Encyclopedia of fish physiology: volume 1*. Academic press, Elsevier.
- Resende, E.K, Catella, A.C., Nascimento, F.L., Palmeira, S.S., Pereira, R.A.C., Silva Lima, M. & Almeida, V.L.V. (1995). *Biologia do curimatá (Prochilodus lineatus), pintado (Pseudoplatystoma corruscans) e cachara (Pseudoplatystoma fasciatum) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil*. EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal – CPAP. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Corumbá, MS.
- Romagosa, E. (2010). Reproductive status in females of the Brazilian catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. *Journal of Applied Ichthyology* **26**, 806–811.
- Romagosa, E., Narahara, M.Y. & Fenerich-Verani, N. (2001). Stages of embryonic development of the “matrinã”, *Brycon cephalus* (Pisces: Characidae). *Boletim do Instituto de Pesca* **27**, 27 – 32
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. & Nash, J.P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**, 1–28. A
- Sanches, E.A., Marcos, R.M., Okawara, R.Y., Caneppele, D., Bombardelli, R.A. & Romagosa, E., (2013). Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *Journal of Applied Ichthyology* **29**, 1114–1122.
- Sant’anna, J.F.M. (2009). *Variáveis reprodutivas do surubim do Iguaçu (Steindachneridion melanodermatum) e comparação do desenvolvimento ontogenético com o jundiá (Rhamdia quelen)*. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Evolutiva. Universidade do Centro Oeste do Paraná. UNICENTRO. Ponta Grossa.
- Sary, C. (2014). *Desenvolvimento ovocitário e testicular de Rhamdia voulezzii e Steindachneridion melanodermatum, espécies endêmicas do rio Iguaçu, Paraná, Brasil*. Dissertação entregue ao Programa de Pós graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Universidade estadual do Oeste do Paraná. Toledo, PR.
- Schulz, R., De Franca, L., Lareyre, J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H. & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 390-411.
- Schulz, R.W. & Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 43–56.
- Schulz, R.W. & Goss, H.J.Th (1999). Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* **177**, 5–12

- Schulz, R.W. & Nóbrega, R.H. (2011). Anatomy and histology of fish testis. In: Farrel, A.P., Cech Jr., J.J., Richards, J.G. & Stevens, E.D. *Encyclopedia of fish physiology: volume 1*. Academic press, Elsevier.
- Schulz, R.W., Zandbergen, M.A., Peute, J., Bogerd, J., Van Dijk, W. & Goos, H. J. Th. (1997). Pituitary gonadotrophs are strongly activated at the beginning of spermatogenesis in African catfish, *Clarias gariepinus*. *Biology of Reproduction* **57**, 139-147.
- Sereia, D.A.O. (2010). *Caracterização do desenvolvimento ontogenético de Steindachneridion melanodermatum* (Garavello, 2005) (Pisces, Siluriformes) da bacia do rio Iguaçu, Brasil. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de pós graduação em Zootecnia. Marechal Candido Rondon, PR: UNIOESTE.
- Stacey, N (2003). Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 229–235.
- Streit Jr., D.P., Moraes, G.V., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Souza, E.D. & Oliveira, C.A.L. (2004). Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR* **7**, 157–162.
- Strüssmann, C.A., Takashima, F. & Toda, K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* **139**, 31-45
- Suzuki, H.I., Bulla, C.K., Agostinho, A.A. & Gomes, L.C. (2003). Estratégias Reprodutivas das assembleias de Peixes de Reservatórios do Estado do Paraná e Bacias Limítrofes. In: Workshop: Produtividade em reservatórios e bioindicadores. Anais do evento. Maringá, UEM, Nupelia, 251-257.
- Swanson, P., Dickey, J.T. & Campbell, B. (2003). Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 53–59.
- Tracker, C. & Grier, H. (2005). Unusual gonad structure in the paedomorphic teleost *Schindleria praematura* (Teleostei: Gobioidi): a comparison with other gobioid fishes. *Journal of Fish Biology* **66**, 378–391.
- Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **6**, 287- 318.
- Vazzoler, A.E.A.M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM.
- Viveiros, A.T.M., Maria, A.N., Amaral, T.B., Orfa, L.H., Isau, Z.A., Ver|ássimo-Silveira, R. (2011). Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02860.x
- Vizziano, D., Baron, D., Randuineau, G., Mahe, S., Cauty, C. & Guiguen, Y. (2008). Rainbow Trout Gonadal Masculinization Induced by Inhibition of Estrogen Synthesis Is More Physiological Than Masculinization Induced by Androgen Supplementation. *Biology of Reproduction* **78**, 939–946.

- Wildner, D.D., Grier, H. & Quagio-Grassiotto (2013). Female germ cell renewal during the annual reproductive cycle in Ostariophysians fish. *Theriogenology* **79**, 709–724.
- Wolff, R.B., Gomes, R.C.T., Verna, C, Maioral, G.C.C.C., Rampazo, T.C., Simões, R.S., Baracat, E.C., Soares Júnior, J.M. (2012). Aspectos moleculares dos esteroides sexuais sobre a cartilagem e os ossos. *Revista da Associação médica brasileira* **58**, 493-497
- Woyнарovich, E. & Horvath, L. (1983). *A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão*. FAO/CODEVASF/CNPq, Brasília.
- Zaniboni-Filho, E. & Nuner, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes (2004). In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M. & Castagnolli, N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. TecArt, São Paulo.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **197**, 99-136