

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

**Vitelogênese pós-desova em lambaris,
Astyanax altiparanae, mantidos em
laboratório.**

Lieschen Valeria Guerra Lira

Jaboticabal, São Paulo

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Vitelogênese pós-desova em lambaris,
Astyanax altiparanae, mantidos em
laboratório.**

Mestranda: Lieschen Valeria Guerra Lira

Orientador: Sérgio Ricardo Batlouni

Coorientador: Rafael Yutaka Kuradomi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2015

Guerra Lira, Lieschen Valeria
G934v Vitelogênese pós-desova em lambaris, *Astyanax altiparanae*,
mantidos em laboratório. / Lieschen Valeria Guerra Lira. --
Jaboticabal, 2015
xiv, 39 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2015

Orientador: Sérgio Ricardo Batlouni

Coorientador: Rafael Yutaka Kuradomi

Banca examinadora: Laura Satiko Okada, George Shigueki Yasui
Bibliografia

1. *Astyanax altiparanae*. 2. Reprodução. 3. Lambari do rabo
amarelo. 4. ovócitos vitelogênicos. 5. E₂. 6. 17 α -OHP. 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

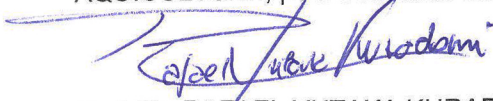
TÍTULO: Vitelogenese pós-desova em lambaris, *Astyanax altiparanae*, mantidos em laboratório


AUTORA: LIESCHEN VALERIA GUERRA LIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RAFAEL YUTAKA KURADOMI

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


Prof. Dr. RAFAEL YUTAKA KURADOMI
Laboratório de Reprodução de Peixes do CAUNESP


Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. GEORGE SHIGUEKI YASUI
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga

Data da realização: 27 de novembro de 2015.

Quando me amei de verdade, compreendi que em qualquer circunstância, eu estava no lugar certo, na hora certa, no momento exato.

Quando me amei de verdade, pude perceber que minha angústia, meu sofrimento emocional, não passa de um sinal de que estou indo contra minhas verdades.

Quando me amei de verdade, parei de desejar que a minha vida fosse diferente e comecei a ver que tudo o que acontece contribui para o meu crescimento.

Quando me amei de verdade, comecei a perceber como é ofensivo tentar forçar alguma situação ou alguém apenas para realizar aquilo que desejo, mesmo sabendo que não é o momento ou a pessoa não está preparada, inclusive eu mesmo.

Quando me amei de verdade comecei a me livrar de tudo que não fosse saudável... Pessoas, tarefas, tudo e qualquer coisa que me pusesse para baixo.

Quando me amei de verdade, deixei de temer o meu tempo livre e desisti de fazer grandes planos, abandonei os projetos megalômanos de futuro.

Hoje faço o que acho certo, o que gosto, quando quero e no meu próprio ritmo.

Quando me amei de verdade, desisti de querer sempre ter razão e, com isso, errei muitas menos vezes.

Quando me amei de verdade, desisti de ficar revivendo o passado e de preocupar com o futuro. Agora, me mantenho no presente, que é onde a vida acontece.

Quando me amei de verdade, percebi que minha mente pode me atormentar e me decepcionar. Mas quando a coloco a serviço do meu coração, ela se torna uma grande e valiosa aliada.

Tudo isso é... Saber viver!

Kim McMillen

POEMA QUEDA PROHIBIDO

- Pablo Neruda -

Queda prohibido llorar sin aprender,
levantarte un día sin saber qué hacer,
tener miedo a tus recuerdos.

Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo,
no convertir en realidad tus sueños.

Queda prohibido no demostrar tu amor,
hacer que alguien pague tus deudas y el mal humor.

Queda prohibido dejar a tus amigos,
no intentar comprender lo que vivieron juntos,
llamarles solo cuando los necesitas.

Queda prohibido no ser tú ante la gente,
fingir ante las personas que no te importan,
hacerte el gracioso con tal de que te recuerden,
olvidar a toda la gente que te quiere.

Queda prohibido no hacer las cosas por ti mismo,
tener miedo a la vida y a sus compromisos,
no vivir cada día como si fuera un último suspiro.

Queda prohibido echar a alguien de menos sin
alegrarte, olvidar sus ojos, su risa,
todo porque sus caminos han dejado de abrazarse,
olvidar su pasado y pagarlo con su presente.

Queda prohibido no intentar comprender a las personas,
pensar que sus vidas valen más que la tuya,
no saber que cada uno tiene su camino y su dicha.

Queda prohibido no crear tu historia,
no tener un momento para la gente que te necesita,
no comprender que lo que la vida te da, también te lo quita.

Queda prohibido no buscar tu felicidad,
no vivir tu vida con una actitud positiva,
no pensar en que podemos ser mejores,
no sentir que sin ti este mundo no sería igual.

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais, Jorge Guerra e Mary Lira

Às minhas irmãs: Lissney e Sayuri

Às minhas avós Alfonsa e Arlinda (in memóriam)

À minha afilhada Lucchiana

À minha tia Gina Guerra

À minha família.

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

À minha família:

Agradeço aos meus pais, Jorge Guerra Valera e Mary Lira Ferreyra, pelo amor e apoio incondicional ao longo da minha vida. Eu sei todo o que vocês lutaram para conseguir que suas filhas se superem na vida e não vou decepcioná-los.

Agradeço à minha tia Gina Guerra, minha segunda mãe, quem sempre me apoiou e foi minha companheira na educação, se não fosse por você eu não estaria onde estou.

Agradeço às minhas mocinhas: Lissney, Sayuri e Lucchianita vocês são o motor e motivo para eu seguir na luta.

Todas minhas conquistas são e serão para vocês, amo muito vocês.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ricardo Batlouni:

Muito obrigada Dr. Sérgio por ter me dado a oportunidade de formar parte da sua equipe. Estarei eternamente agradecida pelo apoio, orientação, motivação constante e sobre tudo pela paciência e os conselhos no meus momentos de crises de ansiedade.

Ao Dr. Rafael Kuradomi

Agradeço ao Rafa pelas ensinanças e conselhos, tanto na parte profissional como pessoal. Também agradeço pela paciência que teve comigo ao momento de me ensinar a trabalhar com molecular, não é fácil não.

Aos amigos do laboratório

Agradeço de todo coração a todos os membros do Laboratório de Reprodução de Peixes Nativos: Gordinho (Thiago), Trick (Patrick), Xininha (Daniel), Gui (Guilherme), Roos (Roosvelt), pela grande ajuda, amizade e companheirismo, tenho certeza que sem vocês não poderia ter concretizado com sucesso este trabalho.

AGRADECIMENTOS:

À Profa. Elizabeth Urbinati, por ter me ajudado muito e por ter facilitado minha vinda ao Brasil.

Ao Dr. Diogo Tenouro e a Dra. Fernanda Nogueira por me ajudarem com sugestões e correções em minha qualificação.

Ao Dr. George Yasui e a Dra. Laura Satiko por ter aceitado ser parte da minha banca de defesa do mestrado.

Ao professor Joao Ademir pela ajuda na parte da estatística.

À todos os funcionários do Caunesp, em especial ao Valdecir, por ter sido sempre tão prestativo quando precisei.

À Vera e David, pela grande ajuda concedida.

À técnica do laboratório central Silvia, pela ajuda e pelo empréstimo de materiais.

As pessoas do CAUNESP que fizeram da minha vida aqui um lugar mais colorido e feliz, Iara, Vito, Lucas, Raquel, Milena, Paulinho, Bruno, Thais. Obrigada pelas boas risadas que compartilhamos juntos!

Ao meus irmãos de coração, Lilliam Otero Pujol, Jesaias Ismael e Carolina Borges por estar sempre presentes nas melhores e piores fases da minha vida em Jaboticabal. Adoro vocês.

À todos meus amigos estrangeiros que me faziam sentir em casa, em especial à Miriam, Oniel, Jefferson e David.

À Camila Kammerer, minha querida parceira de ap, por ter me ajudado, suportado e aconselhado durante a convivência.

Ao André Cau pelo carinho, ensinamentos e o apoio nos momentos que precisei.

Aos companheiros que conheci no Cinema de quintal e Cia fazendo arte que ajudaram muito a aumentar meus conhecimentos culturais sobre a sociedade Brasileira.

Ao Thiago Fernandez pela amizade e ajuda constante.

Ao Bruno Senigalha pelo carinho.

A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram na minha estadia no Brasil e na concretização deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ,
Bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
SUMÁRIO DE FIGURAS	xii
SUMÁRIO DE TABELAS	xiv
CAPÍTULO I	1
1. RESUMO	2
2. ABSTRACT	3
3. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
3.1 Caracterização da espécie em estudo:.....	2
3.2 Reprodução em cativeiro do <i>A. altiparanae</i> :.....	3
3.3 Fisiologia da reprodução-controle endócrino da reprodução de peixes:.....	5
3.4 Desenvolvimento ovariano em peixes:	6
3.5 Desovas múltiplas em cativeiro:.....	7
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPITULO II	14
1. RESUMO	15
2. ABSTRACT	16
3. INTRODUÇÃO	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Manutenção dos peixes:	18
4.2 Reprodutores e condições experimentais:	18
4.3 Parâmetros da qualidade da água:	19
4.4 Indução hormonal e reprodução:.....	19
4.5 Coletas:.....	20
4.6 Avaliação do desempenho reprodutivo.....	20
4.7 Análise descritiva e estereológica dos ovários:.....	21
4.8 Hormônios esteroides:.....	21
4.9 Análises estatísticas:	22
4.10 Certificação do trabalho:	22
5. RESULTADOS	22
5.1 Parâmetros da qualidade da água.....	22

5.2	Desova:	22
5.3	Índice hepatossomático (IHS):	23
5.4	Desempenho reprodutivo:	23
5.5	Análise descritiva das estruturas ovarianas:	24
5.6	Densidade de volume das estruturas ovarianas entre coletas:	27
5.7	Concentração plasmática dos esteróides gonadais:	30
6.	DISCUSSÃO	30
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AIH	Antes da Indução Hormonal
AO	Ovócito atrésico
CPO	Complexo pós ovulatório
DA	Dopamina
DPD	Dias pós desova
DHP	17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona
E ₂	Estradiol
EBHC	Extrato Bruto de Hipófise de Carpa
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de gonadotrofinas
GtHs	Hormônios Gonadotróficos
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown
IHS	Índice Hepatosomático
LH	Hormônio Luteinizante
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NO	Ovócito vitelogênico não ovulado
OPV	Ovócito Pré Vitelogênico
OAC	Ovócito Alveolo Cortical
OVI	Ovócito Vitelogênico Incompleto
OVC	Ovócito Vitelogênico Completo
RPM	Rotações Por Minuto
T	Testosterona
Vtg	Vitelogenina
17 α -OHP	17 α -Hidroxiprogesterona
20 β -HSD	Enzima 20 β -hidroxisteróide-desidrogenase
cyp19a1a	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a

SUMÁRIO DE FIGURAS

Fig. 1. Índice hepatossomático de fêmeas de *A. altiparanae*, ao longo do tempo. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Teste Kruskal Wallis, apresenta os valores máximos e mínimos (extremos da linha vertical), valores do 1° e 3° quartil (extremos do retângulo) e a mediana (segmento de reta dentro do retângulo).23

Fig. 2. Classificação das estruturas ovarianas. Fotomicrografias de secções histológicas de ovário de *A. altiparanae* submetidos a indução hormonal. A: Ovócito pré vitelogênico (OPV); B: Ovócito alvéolo cortical (OAC); C: Ovócito vitelogênico incompleto (OVI); D: Ovócito vitelogênico completo (OVC); E: Vitelogênico com vesícula germinativa migrada e não ovulada (GVBD) (NO); F: Complexos pós-ovulatórios (CPO); G: Ovócito atrésico (AO). Destacados: núcleo (N); nucléolos (Nu); alvéolos corticais (seta espessa); vesícula germinativa rompida na periferia da célula (Vg); estrutura remanescente formada pelas camadas foliculares e teca (CPO) (setas delgadas). Coloração com Hematoxilina – eosina. **Erro! Indicador não definido.**

Fig. 3. Fotomicrografias de secções histológicas de ovário de *A. altiparanae*. Coleta 1 (A): Predominavam OVC, também continham OPV, OVI e AO. Característica de fêmeas em maturação avançada. Coleta 2 (B): Predominavam OPV e CPO encontraram-se também OAC, OVC, AO e NO. Foi observado muito espaço entre estruturas. Característica de fêmeas que desovaram. Coleta 3 (C): Predominavam OVC, porém tinha também uma frequência relativamente alta de OPV e OVI, também foi observado alguns AO. Característica de fêmeas em maturação intermediária/avançada. Coleta 4 (D): Predominavam OVC e diminuiu a quantidade de OPV, quando comparado aos 6 DPD. Observou-se também alguns OVI e AO. A aparência era similar aos ovários das fêmeas de AIH. Característica de fêmeas em maturação avançada. Coleta 5 (E): Predominavam OVC, com uma frequência relativamente baixa de OPV, OVI e AO, similar ao que foi observado nos ovários das fêmeas em AIH e 16 DPD. Característica de fêmeas em maturação avançada. Objetiva de 5X. Coloração com Hematoxilina – eosina. ...26

Fig. 4. Comparação das frequências das estruturas ovarianas (%) de *A. altiparanae* nos diferentes tempos experimentais. A: Ovócito pré vitelogênicos; B: Ovócito alvéolo cortical; C: Ovócitos vitelogênicos incompletos; D: Ovócitos vitelogênicos completos; E: Ovócitos vitelogênicos completos com vesícula germinativa migrada e não ovulada; F: Complexos pós ovulatórios; G: Ovócitos atrésicos; H: Tecido intersticial. Letras diferentes indicam diferença significativas ($P < 0,05$). Teste Kruskal Wallis, apresenta os valores máximos e mínimos (extremos da linha vertical), valores do 1° e 3° quartil (extremos do retângulo) e a mediana (segmento de reta dentro do retângulo). ... **Erro! Indicador não definido.**

Fig. 5. Níveis plasmáticos de E₂ e 17 α OHP (ng /mL), em *A. altiparanae* nas coletas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Teste Kruskal Wallis, apresenta os valores máximos e mínimos (extremos da linha vertical), valores do 1° e 3° quartil (extremos do retângulo) e a mediana (segmento de reta dentro do retângulo).....30

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Coletas e tempos de cada coleta.....	20
---	----

CAPÍTULO I

1. RESUMO

A possibilidade de desovas sucessivas em condições de laboratório permite um incremento qualitativo e quantitativo na produção aquícola. Estudos recentes indicam que o lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*), apresenta alta plasticidade reprodutiva e que o ciclo reprodutivo pode ser manipulado fora da época de reprodução. Além disso, a manipulação da condição ambiental, pode induzir a desova durante o período de inverno. Por tanto, dado o potencial zootécnico desta espécie e sua crescente procura por parte de produtores, o objetivo deste trabalho foi investigar se a mesma fêmea maturaria novamente em condições laboratoriais, quais seriam as características do processo e o tempo necessário para a realização de uma segunda desova. Os resultados aqui obtidos foram promissores, pois observamos que uma mesma fêmea mantida num sistema de recirculação de água com temperatura controlada ($29,24 \pm 0,42^{\circ}\text{C}$) apresenta ovócitos vitelogênicos completos 6 dias após a desova. A obtenção de ciclos reprodutivos completos em laboratório em curtos períodos inter desovas otimiza o uso do espaço e de água, tornando a produção desta espécie ainda mais adequada aos preceitos de sustentabilidade atrelados à uma aquicultura moderna e competitiva.

Palavra-chave: *Astyanax altiparanae*, reprodução, Lambari do rabo amarelo, ovócitos vitelogênicos.

2. ABSTRACT

The possibility of successive spawning in laboratory conditions permits a qualitative and quantitative increase in aquaculture. Recent studies indicate that the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) presents high reproductive plasticity which the reproductive cycle may be manipulated out of breeding season. In addition, the manipulation of environmental condition, may induce the spawning during winter period. Therefore, given the breeding potential of this species and the increasing demand from fish farmers, the aim of this experiment was to investigate if the same female can prepare for a second induced spawning at laboratory conditions, what are the characteristics of the process and the time required to perform this second spawning. The results obtained were promising, as we observed that the same female maintained in a recirculating water system at a controlled temperature ($29.24 \pm 0.42^{\circ}\text{C}$) presents vitellogenic oocytes 6 days after spawning. Obtaining complete reproductive cycles in the laboratory at short inter spawning period optimize the use of space and water, making the production of this species appropriate for a modern, sustainable and competitive aquaculture.

Key-words: *Astyanax altiparanae*, reproduction, yellowtail tetra, vitellogenic oocytes.

3. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Atualmente, os peixes constituem uma fonte essencial de alimentos nutritivos e proteína animal para grande parte da população mundial (FAO, 2012). Entre 1980 a 2012, a aquicultura continental aumentou progressivamente sua produção total de peixes comestíveis em 13% (FAO, 2014). O Brasil melhorou significativamente sua posição mundial nos últimos anos, ocupando o décimo segundo lugar em produção (FAO, 2014); este resultado depende consideravelmente da aquicultura continental de peixes de escama que representa 86,6% da produção total nacional (MPA, 2011). No entanto, considerando que a maioria dos cultivos são realizados com espécies exóticas (Godinho, 2007), tais como a carpa comum (*Ciprinus carpio*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*), a participação das espécies nativas na piscicultura fica abaixo dos 20% (1º Anuário de pesca e aquicultura, 2014).

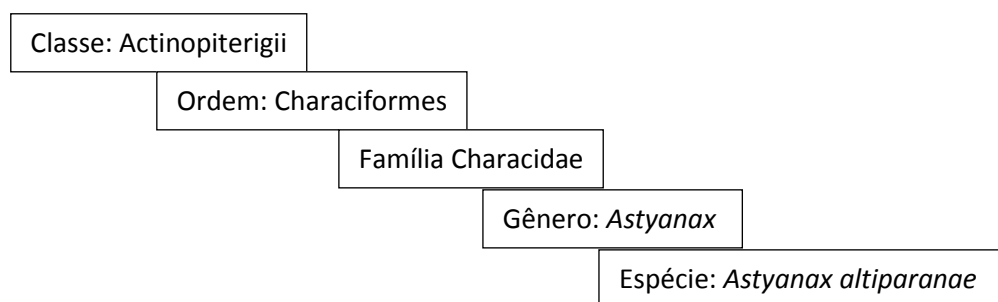
Nos últimos anos foram realizadas muitas pesquisas para a domesticação de novas espécies da ictiofauna brasileira com grande potencial na aquicultura, como pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), curimatã (*Prochilodus lineatus*), piau (*Leporinus freiderici*) entre outros, as quais já formam parte da produção nacional (MPA, 2011). O interesse por parte dos piscicultores pela produção de algumas espécies de pequeno porte, como o Tambiú ou Lambari (*Astyanax* sp.) tem aumentado (Porto-Foresti et al., 2010).

Os lambaris são considerados como uma opção interessante dentre as espécies nativas de interesse para a aquicultura, possivelmente por suas características biológicas, tais como, alta prolificidade, reprodução parcelada, rusticidade e fácil manejo (Porto-Foresti et al., 2001). Além disso, podem ser usados para consumo direto (como petisco), na forma de conservas, aproveitado como alimento natural ou forragem na criação de peixes carnívoros (Paiva, 1997; Garutti, 2003), como larvófagos no combate às larvas de pernilongos (Garutti, 2003, Sato et al., 2006) ou ainda serem comercializados como isca viva para a pesca esportiva (Porto-Foresti et al., 2010; Silva et al., 2011). Atualmente também vem sendo utilizada como modelo biológico (Drummond et al., 2000; Gomes et al., 2013; Santana et al., 2015).

3.1 Caracterização da espécie em estudo:

A Família Characidae, da qual o lambari faz parte, é a maior e mais complexa de peixes brasileiros de água doce, nela estão peixes de hábitos alimentares muito diversificados e que exploram uma grande variedade de habitats (Mirande, 2010). O gênero *Astyanax*, inclui cerca de 100 espécies, vulgarmente conhecidas como lambari, piaba ou tambuí (Lima et al., 2003), as quais antigamente faziam parte da sub-família Tetragonopterinae porém pela divergência de dados monofiléticos, estão incluídas atualmente em um grupo provisório denominado “incertae sedis” (Lima et al., 2003).

Outrora se acreditava que os lambaris pertencentes à espécie *Astyanax bimaculatus* apresentavam uma ampla distribuição geográfica, desde à bacia do rio da prata até o Panamá. No entanto, revisões sistemáticas e filogenéticas realizadas no gênero *Astyanax* (presentes nas bacias do Paraná, do São Francisco e Amazônica) demonstraram que *A. bimaculatus* correspondia a várias espécies. Dessa forma, houve a necessidade da reestruturação da nomenclatura das espécies deste gênero resultando na descrição de 21 novas espécies; dentre elas o *Astyanax altiparanae* (lambari do rabo amarelo) espécie recorrente na bacia do Rio Tietê e seus afluentes (Garutti, 1995; Garutti e Britski, 2000).



O *A. altiparanae*, foco de nosso estudo, pode ser reconhecido por apresentar nadadeiras dorsal e caudal amarelas, uma mancha umeral de forma oval e mancha no pedúnculo caudal estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos (Garutti, 1995). O *A. altiparanae* é de porte pequeno (de 10 a

15 cm), com hábito alimentar onívoro, podendo chegar a 60 gramas de peso corporal (Porto-Foresti et al., 2010).



Durante o período reprodutivo, há evidências de dimorfismo sexual, sendo as fêmeas de maior porte (9-12 cm), com corpo arredondado e papila com irrigações sanguíneas; e os machos de menor porte (7-9 cm), com corpo alongado e espículas, ásperas ao tacto, na nadadeira anal (Porto-Foresti et al., 2010). O *A. altiparanae* apresenta desova parcelada com período reprodutivo longo, que se estende de setembro a março (Agostinho et al., 1984, Vazzoler, 1996) e/ou de outubro a fevereiro (Sato et al., 2006), fertilização externa, ovócitos pequenos e semi adesivos (Weber et al., 2012). A espécie se reproduz tanto em ambientes aquáticos lânticos como lóticos (Godinho, 2010) sem evidencias de cuidado parental ativo (Suzuki et al., 2005). Há relatos de maturação sexual aos quatro meses de idade em condições de cativeiro (Silva et al., 1996).

3.2 Reprodução em cativeiro do *A. altiparanae*:

Para assegurar o sucesso reprodutivo de uma espécie em cativeiro é essencial conhecer bem sua biologia reprodutiva, para isso é importante desenvolver pacotes tecnológicos e estabelecer metodologias claras de produção.

De modo geral, é importante a escolha de espécies condizentes com as características físicas do ambiente, bem como a adoção do manejo adequado para cada espécie (Andrade e Yasui, 2003), já que a eficiência reprodutiva é dependente de diversos fatores que atuam conjuntamente para que a reprodução resulte na obtenção de grande quantidade de larvas sadias. Dentre estes fatores podemos citar os cuidados que vão desde o manuseio e manutenção dos

reprodutores no período pré-reprodução, até cuidados pós-fertilização (Murgas et al. 2012).

A reprodução do *A. altiparanae*, pode ser natural ou mediante a indução hormonal. No primeiro caso, os reprodutores, em estágio de maturação avançada, são alocados em um tanque com condições adequadas (qualidade de água, alimentação, nutrição e densidade de estocagem) onde ocorre a reprodução naturalmente. Outra maneira de reprodução natural é mediante estresse, manipulando o nível da água (Chehade et al., 2015). A desvantagem deste processo é a predação realizada pelos próprios reprodutores, a impossibilidade do controle de densidade ou heterogeneidade dos mesmos (Porto-Foresti et al., 2010, Silva et al., 2011). No segundo caso é realizado um protocolo de indução hormonal para promover o processo de ovulação e espermição, a vantagem deste processo é que permite um melhor controle, planejamento e otimização da produção (Andrade e Yasui, 2003; Porto-Foresti et al., 2010).

Para a manipulação hormonal, podem ser utilizados vários tipos de hormônios, dentre eles os extratos hormonais naturais, como extrato hipofisário de carpa (*Cyprinus carpio*), e os produtos sintéticos, tais como análogos de GnRH e LHRH (Porto-Foresti et al., 2010), contudo, existem divergências quanto ao número de doses aplicadas, segundo Woynarovich e Horváth (1983), as doses parceladas produzem melhores resultados que uma única dose. Geralmente são as fêmeas que requerem maiores doses de hormônio, normalmente duas aplicações: uma pequena dose para estimular a migração da vesícula germinal e 12 horas depois, uma dose grande para induzir a quebra da vesícula germinal, ovulação e desova (Woynarovich e Horváth, 1983). Os machos recebem geralmente uma única dose, no momento em que as fêmeas recebem a segunda aplicação (Zaniboni Filho e Weingartner, 2007). Sato et al. (2006) obtiveram resultados positivos ao usar dose única (6 mg/kg) de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), o que acarreta uma menor manipulação dos reprodutores, diminuindo o estresse.

Com relação ao sistema usado para a fertilização dos gametas, o *A. altiparanae* não apresenta bons resultados quando submetidos ao processo de extrusão manual de gametas para fertilização em bacias, portanto, nesta espécie

melhores resultados são obtidos quando os gametas são liberados naturalmente e a desova coletada ao final do processo (desova semi natural) (Porto-Foresti et al., 2010). Neste sistema, a proporção sexual utilizada é de dois machos para cada fêmea e o horário da desova é estimado pelo cálculo de horas grau. Com relação ao período de latência desta espécie, trabalhos preliminares do nosso grupo de pesquisa demonstraram, se mantidos a temperatura controlada de $29,24 \pm 0,42^{\circ}\text{C}$, a desova desta espécie ocorre a 145 horas grau após à injeção do hormônio (6mg/kg). Felizardo et al. (2012) conseguiram a desova à 240 – 334 horas grau com $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e Porto-Foresti et al. (2010) indicaram de 180 a 250 horas grau com $25 - 28^{\circ}\text{C}$. É importante considerar o tempo estimado da desova, porque existe predação dos próprios ovos por parte dos reprodutores.

3.3 Fisiologia da reprodução-controle endócrino da reprodução de peixes:

Em teleósteos, a reprodução de peixes é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Para o desencadeamento da reprodução, as interações entre fatores endógenos e ambientais são de suma importância (Mylonas et al., 2010; Rizzo e Bazzoli, 2014). Variações ambientais, como volume e características da água, temperatura e fotoperíodo, são captadas por órgãos sensoriais, como a glândula pineal e receptores cutâneos (Prötner, 2002; Korf, 2006) e transmitidos via neurônios sensoriais para o hipotálamo. Desta forma, o hipotálamo regula a síntese e liberação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), e a dopamina (DA). O GnRH age nas células gonadotrópicas da hipófise estimulando a liberação de hormônios gonadotróficos (GtHs) e a DA atua na hipófise inibindo a liberação de GtHs, atenuando a ação do GnRH (Peter e Yu, 1997; Yaron e Levavi-Sivan, 2011). A hipófise produz dois GtHs que atuam diretamente nas gônadas. Os hormônios folículo estimulantes (FSH ou GtH I) e o hormônio luteinizante (LH ou GtH II) regulam respectivamente a vitelogênese e a maturação final do ovócito (Nagahama, 1994; Vazzoler, 1996; Peter e Yu, 1997; Nagahama e Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2010; Mylonas et al., 2010)

Nas fêmeas, o FSH estimula a conversão do colesterol em testosterona (T) nas células da teca dos ovócitos (Nagahama e Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2010). A aromatização da T pela aromatase (cyp19a1a) (Simpson et al., 1994), nas células da granulosa do folículo ovárico, resulta na produção de 17β -estradiol

(E₂) (Nagahama, 1994). O incremento de E₂ no plasma estimula a síntese de vitelogenina (VGT) no fígado. A VGT, proteína precursora do vitelo, é incorporada ao ovócito através de endocitose (Jalabert, 2005, Reading et al., 2011, Mizuta et al., 2013) e o vitelo é acumulado no ovócito servindo como substância de reserva necessária para o desenvolvimento adequado do embrião (Lubzens et al., 2010; Mylonas et al., 2010; Tokarz et al., 2015).

Ao finalizar a vitelogênese, se incrementam os níveis plasmáticos do LH, o qual estimula a camada da teca a sintetizar o 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP), que é convertida a 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) na camada granulosa, pela enzima 20 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (20 β -HSD) (Nagahama e Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2010). O DHP é conhecido como o hormônio indutor da maturação final e da ovulação (Zohar e Mylonas, 2001a; Nagahama e Yamashita, 2008).

3.4 Desenvolvimento ovariano em peixes:

A intensificação do cultivo de espécies de peixes nativos demanda o incremento de pesquisas básicas sobre a biologia reprodutiva das espécies para o desenvolvimento de sistemas de criação adequados. Diversas estratégias reprodutivas possibilitam o sucesso reprodutivo em ambientes distintos. Assim informações sobre o tipo de desova (relacionado ao tipo de desenvolvimento ovocitário) e a frequência de liberação de ovócitos maduros em um período de reprodução são de suma importância para estabelecer o cultivo de novas espécies de peixes (Braz, 2009).

Neste contexto, são descritos três modos de desenvolvimento ovocitário (Wallace e Selman, 1981): a) sincrônico, quando todos os ovócitos desenvolvem-se simultaneamente, b) sincrônico em grupo, onde pelo menos dois grupos de ovócitos podem ser observados no ovário durante a temporada reprodutiva, e c) assincrônico, caracterizado pela presença de lotes de ovócitos em vários estádios de desenvolvimento, sem predominância de qualquer um deles. No primeiro caso, está associado às espécies que desovam apenas uma única vez e morrem, como os salmões (*Salmo sp.*); o segundo caso é característico de espécies que desovam em estação reprodutiva de curta duração como os peixes de piracema tais como o dourado (*Salminus sp.*), o surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*), o

pacu (*Piaractus mesopotamicus*), dentre outros (Rizzo e Bazzoli, 2014). O último caso está associado a espécies que desovam várias vezes em uma estação reprodutiva prolongada, incluindo neste grupo as piranhas (*Pygocentrus nattereri*), os lambaris (*Astyanax sp.*), o jundiá (*Rhamdia sp.*) e outros. (Rizzo e Bazzoli, 2014).

De acordo com a frequência de liberação dos ovócitos, as desovas podem ser classificadas em total ou parcelada (múltipla). Na desova total, os ovócitos têm maturação sincrônica e são liberados de uma única vez em um período do ano. Os peixes de desova total normalmente são reofílicos (Godinho, 2007). Por outro lado, na desova parcelada ou múltipla, os ovócitos maturam em lotes distintos, sendo eliminados em intervalos, ao longo de um período reprodutivo, ou ainda, sem sazonalidade (Zaniboni-filho e Weingart, 2007). Os peixes de desova parcelada geralmente desovam em águas mais calmas e estáveis. Segundo McEvoy e McEvoy (1992) esta estratégia reprodutiva possibilita a maior probabilidade de sobrevivência da espécie; reduzindo a predação de ovos e larvas, o risco de desova em condições hidrográficas e climáticas desfavoráveis e a competição por locais de desova e alimentação.

3.5 Desovas múltiplas em cativeiro:

Como mencionado anteriormente, as desovas sucessivas ou parceladas, são características de espécies que apresentam desenvolvimento ovocitário sincrônico em grupo ou assincrônico. Em condições de cativeiro, relatos de desovas parceladas são muito comuns em espécies de água salgada, na qual, o intervalo entre desovas pode ser considerado curto. Neste contexto podemos citar: “amber jack” (*Seriola dumerili*) desova 2 vezes seguidas em 3 dias (Mylonas et al., 2004), o “black sea bass” (*Centropristis striata*) desova 4 vezes em 7 dias (Watanabe et al., 2003), e “dusky grouper” (*Epinephelus marginatus*) desova 7 vezes em um período de 10 dias (Marino et al., 2003). Já no caso de peixes de água doce, normalmente o intervalo entre as desovas é mais longo, como por exemplo, a “tilápia” (*Oreochromis niloticus*), em condições adequadas desova cada 30-40 dias (Lazard et al., 1996), “Apaiari” (*Astronotus ocellatus*) desova 3-4 vezes por ano (Silva et al., 1993). Existem muitas outras espécies promissoras para a aquicultura, que apresentam o período reprodutivo longo com desovas

múltiplas, mas que se desconhece o intervalo entre desovas, informação importante para criação de espécies em cativeiro, dentre as quais podemos citar: *Rhamdia quelen* (Baldisserotto et al., 2010), *Oligosarcus hepsetus* (Gomiero et al., 2008), *Metynnis maculatus* (Pereira et al., 2013).

Promover desovas múltiplas em laboratório é uma alternativa que possibilita uma maior produção de peixes em tamanho comercial durante maior parte do ano, atendendo assim a demanda de mercado

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, C.A., Molinari, S.L., Agostinho, A.A., Verani, J.R., 1984. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambarí, *Astyanax bimaculatus* (L.) (Osteichthyes- Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. Rev. Bras. Biol. 44(1), 31-36.
- Andrade, D.R., Yasui, G.S., 2003. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. Rev. Bras. Reprod. Anim. 27(2), 166-172.
- Baldisserotto, B., Neto, J.R., Barcellos, L.G., 2010. Jundiá (*Rhamdia sp.*). In: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), Espécies Nativas para piscicultura no Brasil. 2da edição, Editoraaufsm, Santa Maria, RS, pp. 101-115.
- Braz, A.R., 2009. Desova e fecundidade em peixes de água doce e marinhos. Rev. biol. ciênc. Terra 9, 24-31.
- Chehade, C.H., Cassel, M., Borella, I., 2015. Induced reproduction in a migratory teleost species by wáter level drawdown. Neotrop. Ichthyol. 13(1), 205-212.
- Drummond, C.D., Bazzoli, N., Rizzo, E., Sato, Y., 2000. Postovulatory follicle: A model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. J. Exp. Zool. B. 287, 176–182.
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture - 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma, Italy.

- FAO, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture - 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma, Italy.
- Felizardo, V.O., Murgas, L.D.S., Andrade, E.S., Lópes, P.A., Freitas, R.T.F., Ferreira, M.R., 2012. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax altiparanae*). *Theriogenology* 77, 1570–1574.
- 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura, 2014. Associação Cultural e Educacional Brasil-ACEB. Ministério de Pesca e Aquicultura. Brasília.
- Garutti, V., 2003. Piscicultura ecológica. São Paulo: Editora UNESP. 332 pp.
- Garutti, V., Britski, H.A., 2000. Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Sér. Zool.* 13, 65-88.
- Garutti, V., 1995. Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. São Jose do Rio Preto, Tese de Livre-Docência, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, 286 pp.
- Godinho, H.P., 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 3 (13), 351-360.
- Godinho, A.L., Lamas, I.R., Godinho, H.P., 2010. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. *Environ. Biol. Fish.* 87, 143-162.
- Gomes, C.C., Costa, F.G., Borella, M.I., 2013. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). *Micron* 52-53, 33-38.
- Gomiero, L.M., Garuana, L., Braga, F.M.S., 2008. Reproduction of *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) (Characiforms) in the Serra do Mar State Park, São Paulo, Brazil. *Braz. J. Biol.* 68(1), 187-192.

- Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 261–279.
- Korf, H.M., 2006. The pineal organ In: Reinecke, M., Zaccone, G., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Endocrinology*. Vol 2, Science Publishers, USA.
- Lazard, J., Legendre, M., 1996. The spontaneous reproduction of Tilapia: an opportunity or handicarp for the development of African aquaculture?. In: Pullin, R.S.V., Lazard, J., Legendre, M., Amon Kothias, J.B., Pauly, D. (Eds.), *The Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, pp. 77-91.
- Lima, F.C.T., Malabarba, L.R., Buckup, P.A., Pezzi da Silva, J.F., Vari, R., Harold, P.A., 2003. Genera incertae sedis in Characidae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr, C.J. (Eds.), *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*, pp.68-106.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocr.* 165, 367-389.
- MPA, 2011. Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2011. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília.
- Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M.G., Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture* 219, 841-858.
- Mizuta, H., Luo, W., Ito, Y., Mushiobira, Y., Todo, T., Hara, A., Reading, B.J., Sullivan, C.V., Hiramatsu, N., 2013. Ovarian expression and localization of a vitellogenin receptor with eight ligand-binding repeats in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Comp. Biochem. Phys. B* 166(1), 81-90.
- Mirande, J.M., 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotrop. Ichthyol.* 8, 385-568.
- McEvoy, L.A., J. McEvoy, 1992. Multiple spawning in several commercial fishes and its consequences for fisheries management, cultivation and experimentation. *J. Fish Biol.* 41, 125-136.

- Murgas, L.D., Felizardo, V.O., Ferreira, M.R., Veras, G.C., Andrade, E.S., Galileu, 2012. Eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. *Ciência Animal*. 22(1), 197-206.
- Mylonas, C.C., Papandroulakis, N., Smboukis, A., Papadaki, M., Divanach, P., 2004. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. *Aquaculture* 237, 141-154.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocr.* 165, 516-534.
- Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 217-229.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev. Growth Differ.* 50, 195-219.
- Paiva, R., 1997. Lambari, de invasor a hóspede. *Revista Globo Rural* 11(142), 49-53.
- Pereira, T.S.B., Moreira, R.G., Batlouni, S.R., 2013. Dynamics of ovarian maturation during the reproductive cycle of *Metynnis maculatus*, a reservoir invasive fish species (Teleostei: Characiformes). *Neotrop. Ichthyol.* 11(4), 821-830.
- Peter, R.E., Yu, K.L., 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basics applied aspects. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 7, 173-197.
- Porto- Foresti, F., Castilho-Almeida, R.B., Senhorini, J.A., Foresti, F., 2010. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies Nativas para piscicultura no Brasil*. 2da edição, Editoraufsm, Santa Maria, RS, pp. 101-115.
- Porto- Foresti, F., Oliveira, C., Foresti, F., Castilho-Almeida, R.B., 2001. Cultivo do lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. *Panorama da Aqüicultura* 11, 15-19.

- Prötner, H.O., 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Phys. A.* 132, 739-761.
- Reading, B.J., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., 2011. Disparate Binding of Three Types of Vitellogenin to Multiple Forms of Vitellogenin Receptor in White Perch. *Biol. Reprod.* 84(2), 392-399.
- Rizzo, E., Bazzoli, N., 2014. Reprodução e embriogênese. In: Baldisserotto, B., Possebon, J.E., Criscuolo, E. (Eds.), *Biología e fisiología de peixes neotropicais de água doce*. FUNEP, pp. 265- 284.
- Sato, Y., Sampaio, E.V., Fenerich-Verani, N., Verani, J.R., 2006. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 23(1), 267-273.
- Santana, C.A., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R., Yukimitu, K., Moraes, J.C.S., Lima, S.M., 2015. Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy applied in fish scales to access environmental integrity: A case study of *Astyanax altiparanae* species. *Infrared Phys. Techn.* 72, 84-89
- Silva, N.J.R., Lopes, M.C., Fernandes, J.B.K., Henriques, M.B., 2011. Caracterização dos sistemas de criação e da cadeia produtiva do lambari no estado de São Paulo, Brasil. *Informações Econômicas*, São Paulo, 41(9), 17-28.
- Silva, J.V., Andrade, D.V., Okano, W.Y., 1996. Desenvolvimento sexual e crescimento de lambaris – tambuí, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758, submetidos a diferentes tipos de alimentação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48(1), 47-54.
- Silva, J.W.B., Regis, R.C., Bezerra, A.T., 1993. Produção de alevinos de apaiari, *Astronotus ocellatus ocellatus* (Cuvier, 1829) Swainson, 1839, em viveiros. *Ciênc Agron. Fortaleza* 24, 22-26.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarnah, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D.,

1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15, 342-355.
- Suzuki, H.I., Bulla, C.K., Agostinho, A.A., 2005. Estratégias reprodutivas de assembléias de peixes em reservatórios In: Rodrigues, L., Thomaz, S.M., Agostinho, A.A., Gomes, L.C. (Eds.), *Biocenoses em reservatórios Padrões espaciais e temporais*. RiMa, São Carlos, pp. 223-236.
- Tokarz, J., Moller, G., Hrabe, M., Adamski, J., 2015. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids* 103, 123-144.
- Vazzoler, A.E.A.M., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteros: teoria e prática*. EDUEM, Maringá, São Paulo. 169 pp.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21, 325–343.
- Watanabe, W.O., Smith, T.I.J., Berlinsky, D.L., Woolridge, C.A., Stuart, K.R., Copeland, K.A., Denson, M.R., 2003. Volitional spawning of black sea bass *centropristis striata* induced with pellet luteinizing hormone releasing hormone-analogue. *J. World Aquacult. Soc.* 34, 319-331.
- Weber, A.A., Pereira, F., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2012. Oocyte adhesiveness and embryonic development of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces:Characidae) . *Zygote* 21(2), 198-202.
- Woynarovich, E., Horvath, L., 1983. *The artificial propagation of warm-water finfishes-A manual for extension*. Traduzido por Chama, Escopo, Brasília. 220 pp.
- Yaron, Z., Levavi-Sivan, B., 2011. Endocrine Regulation of Fish Reproduction In: Farrell, A.P. (Eds.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. San Diego 2, 1500–1508.
- Zaniboni – Filho, E., Weingartner, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31(3), 367-373.
- Zohar, e Mylonas, C.C., 2001a. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99–136.

CAPITULO II

Vitelogênese pós-desova em lambaris, *Astyanax altiparanae*, mantidos em laboratório.

1. RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a possibilidade de se obter desovas sucessivas de *A. altiparanae* (lambaris) mantidos em laboratório e descrever as características reprodutivas. Para isso, 104 lambaris do rabo amarelo adultos (40 fêmeas e 64 machos) foram mantidos em sistema de recirculação de água com temperatura controlada ($29,24 \pm 0,42^{\circ}\text{C}$). Para a reprodução, 32 fêmeas e 64 machos foram distribuídos aleatoriamente em quatro caixas d'água, na proporção de 8 fêmeas:16 machos. Foram coletadas amostras de ovários e sangue de oito fêmeas, antes da indução hormonal (AIH), 0, 6, 16 e 30 dias pós desova (DPD). Surpreendentemente, aos 6 DPD as fêmeas desovadas já apresentavam ovários completamente maduros, os quais mantiveram as mesmas características até 30 DPD, sugerindo que as fêmeas podem ser induzidas à uma segunda desova em qualquer momento deste intervalo. Aos 6 DPD observamos complexos pós ovulatórios (CPOs) pela última vez, indicando que a reabsorção dos mesmos é relativamente rápida e ocorre entre 0 e 6 DPD. Concomitantemente, as maiores concentrações dos esteroides gonadais: 17β -estradiol (E_2) e 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP) foram encontradas em 6 DPD, o que respectivamente corrobora e sugere que neste intervalo os ovários de *A. altiparanae* encontram-se em intensa atividade vitelogênica e possivelmente aptos para uma nova desova. As fêmeas, particularmente aquelas geneticamente melhoradas ou utilizadas em cruzamentos dirigidos de programas de repovoamento, podem potencialmente serem induzidas à desova o ano todo, sucessivas vezes, tendo seu potencial intensamente explorado. Por último, a obtenção de ciclos reprodutivos completos no laboratório em intervalos curtos permite otimizar o uso de água e espaço com viveiro, tornando a produção desta espécie ainda mais adequada aos preceitos de sustentabilidade atrelados à uma aquicultura moderna e intensiva.

Palavra-chave: *Astyanax altiparanae*, Lambari do rabo amarelo, reprodução, ovócitos vitelogênicos, E_2 , 17α -OHP.

Vitelogenesis post-spawning in Lambari, *Astyanax altiparanae*, kept in the laboratory

2. ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the possibility of obtain successive spawn from *A. altiparanae* (lambaris) in laboratory conditions and describe the reproductive characteristics. For this, 104 adult yellowtail tetra (40 males and 64 females) were kept in a water recirculation system with controlled temperature ($29.24 \pm 0.42^{\circ}\text{C}$). For breeding, 32 females and 64 males were distributed randomly into 4 tanks at a 8 female:16 male ratio. Ovaries and blood samples of 8 female were collected, before the hormonal induction, 0, 6, 16 and 30 days after spawning (DAS). Surprisingly, at 6 DAS the spent females presented fully mature ovaries, which was maintained until 30 DAS, suggesting that the females can be induced to a second spawn during this interval. After 6 DAS it was observed post ovulatory complex (POC) for the last time, indicating that the resorption is relatively rapid and occurs between 0 and 6 DAS. In addition, higher concentrations of gonadal steroids 17β -estradiol (E_2) and 17α -hydroxyprogesterone (17α -OHP) were found at 6 DAS, which supports and suggests that in this range the ovaries of *A. altiparanae* are in intense vitellogenic activity and possibly suitable for a new spawn. Females, particularly those genetically enhanced or used in restocking programs may potentially be induced to spawn all year, successive times, with its potential intensively explored. Finally, obtaining full reproductive cycles in the laboratory at short intervals optimize water and space in hatcheries, making production of this species even more appropriate to the precepts of sustainability linked to a modern, intensive aquaculture.

Key-words: *Astyanax altiparanae*, yellowtail tetra, reproduction, vitellogenic oocytes, E_2 , 17α -OHP.

3. INTRODUÇÃO

Entre os anos 2009 e 2011 a produção de lambari procedente da pesca extrativa foi de aproximadamente 1000 toneladas (MPA, 2011). Neste contexto, a possibilidade de fechar os ciclos reprodutivos de espécies de pequeno porte em laboratório é uma alternativa sustentável que permitiria diminuir o consumo da água (Osório et al., 2004) e talvez ter uma forma contínua de produção (Bezerra et al., 2012). Mais ainda, o controle da maturação ovariana em laboratório permite antever e controlar o momento da indução hormonal e possivelmente até a desova sucessiva de uma mesma fêmea. A possibilidade de desovar sucessivamente a mesma fêmea pode otimizar o uso de matrizes com maior valor agregado, como por exemplo, as linhagens geneticamente melhoradas ou aquelas usadas em cruzamentos dirigidos para preservação de variabilidade genética em programas de peixamento.

O lambari (*Astyanax altiparanae*) é uma das espécies sul-americanas tropicais mais bem estudadas (Agostinho et al., 1984; Porto-Foresti et al., 2001; Silva et al., 2011; Weber et al., 2012; Gomes et al., 2013; Chehade et al., 2015; Evangelista, 2015; Santana et al., 2015). Apresenta crescente interesse em sua produção (Silva et al., 2011) por apresentar ciclo de vida curto, ser de pequeno porte e desovar facilmente (Porto-Foresti et al., 2010). No entanto, o lambari apresenta características únicas, pois é um dispersador de ovos, sem cuidado parental ativo (Suzuki et al., 2005), como a maioria dos peixes de desova total (Godinho, 2007, Godinho et al., 2010), mas apresenta múltiplas desovas e estação reprodutiva longa (Vazzoler, 1996; Sato et al., 2006) similar aos peixes com cuidado parental como os ciclídeos *Oreochromis niloticus* (Turner e Robinson, 2000), *Arapaima gigas* (Fontanele, 1948); *Astronotus ocellatus* (Silva et al., 1993).

Ainda neste contexto, o lambari apresenta uma outra particularidade que é o fato de desovar com uma única dose de EBHC (Sato et al. 2006), diferentemente da maioria das espécies de desova total que precisam de duas doses, sendo uma preparatória e uma final (Woynarovich e Horváth, 1983; Zaniboni Filho e Weingartner, 2007).

Recentemente foi demonstrado que esta espécie pode ser manipulada para desovar fora da estação reprodutiva mantendo os reprodutores em condições artificiais (Evangelista, 2015). Este trabalho mostrou que as desovas obtidas mantendo-se os animais em condições controladas apresentam vantagens sobre àquelas obtidas em ambientes naturais, tais como: maior taxa de fecundidade e maior número de fêmeas que ovulam. Portanto, uma vez que foi demonstrado que a espécie pode ser manipulada para otimizar o processo reprodutivo em laboratório, neste estudo tivemos como principal objetivo investigar se a mesma fêmea maturaria novamente em condições laboratoriais e quais seriam as características do processo e o tempo necessário para a realização de uma segunda desova.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção dos peixes:

Para este estudo foram utilizados lambaris do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) adultos com aproximadamente um ano de idade, oriundos de desova induzida. Estes peixes foram mantidos no Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP (Jaboticabal, SP), em viveiros escavados de 200 m³ abastecidos com vazão constante de água ($\cong 30$ l/min). Os lambaris foram alimentados duas vezes ao dia até a saciedade aparente, com ração comercial extrusada (28,0% de proteína bruta composta, 3,5% de extrato etéreo, 12,0% de cinzas e 9,0% de matéria fibrosa).

4.2 Reprodutores e condições experimentais:

O experimento foi realizado entre os meses de outubro e novembro (Tabela 1). Doze horas antes do início do experimento, 104 espécimes de lambari (40 fêmeas e 64 machos) foram selecionados por possuírem características externas típicas de indivíduos maduros: ventre abaulado e papila urogenital com irrigações (nas fêmeas) e presença de espícula na nadadeira anal (nos machos). Após a seleção, os peixes foram aclimatados e mantidos em condições controladas de temperatura ($29,24 \pm 0,42^\circ\text{C}$), aeração e fotoperíodo natural, em sistema de recirculação fechado. Machos e fêmeas foram mantidos separados em caixas d'água de volume total de 750L (preenchidas com aproximadamente 400L

de água). Durante todo o experimento, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, até a saciedade, com a ração citada no item acima.

4.3 Parâmetros da qualidade da água:

Os parâmetros da qualidade de água, no laboratório, foram mensurados semanalmente, às 8:00 horas. Para isso, foi utilizado um oxímetro YSI 550a (Yellow Spring Incorporation, com acurácia de ± 0.3 mg/L) para medir o oxigênio dissolvido; um medidor YSI pH10A (Yellow Spring Incorporation-precisão de ± 0.2 unidades) para medir o PH; e um condutivímetro HI98311 (Hanna Instruments – acurácia de $0,1\mu\text{S}/\text{cm}$ para condutividade e de $0,15^\circ\text{C}$ para temperatura) para mensuração da condutividade e temperatura.

4.4 Indução hormonal e reprodução:

Para a indução hormonal, tanto as fêmeas como os machos receberam uma dose de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) (6 mg/kg), diluídos em soro fisiológico (0,9%), na região dorsal. Em seguida, 32 fêmeas e 64 machos foram colocados aleatoriamente em 4 caixas d'água retangulares de acrílico (91 x 25 x 10 cm). Cada caixa foi considerada como uma unidade experimental, e continha 8 fêmeas e 16 machos. Os peixes foram submetidos à desova em sistema “semi-natural”, ou seja, os mesmos não foram manipulados ou extrusados durante o pareamento, ovulação, espermiacão ou fertilização. O período de tempo entre a aplicação hormonal e a ovulação foi determinado em “horas grau”, a qual foi definida como o somatório da temperatura da água tomada a cada hora após a aplicação hormonal.

Imediatamente após a desova, determinou – se preliminarmente para todas as fêmeas a ocorrência ou não de desova, mediante a observação das características externas. Consideramos como fêmea desovada aquela que apresentou ventre flácido e retração do contorno externo do abdômen. Após a desova as fêmeas foram devolvidas para as caixas d'água de 750L, nas quais foram mantidas até as subseqüentes coletas (ver tabela 1). Portanto, as fêmeas desovas retiradas de cada uma das quatro caixas de acrílico foram mantidas em separado (sem a presença de machos) em caixas de 750 L, mantendo a composição de quatro unidades experimentais do experimento.

4.5 Coletas:

Foram realizadas cinco coletas em diferentes tempos (Tabela 1), e para cada coleta realizaram-se os seguintes procedimentos. Oito fêmeas escolhidas ao acaso foram eutanasiadas com overdose de benzocaína (500 mg/L) e foram registrados os seguintes dados biométricos: peso corporal (g), comprimento total (cm), comprimento padrão (cm), peso das gônadas (g), do fígado (g) e das vísceras (g). Posteriormente, foi calculado o índice hepatossomático, mediante a seguinte fórmula: (Peso do fígado (g) x peso total (g)) /100.

Também foram coletadas amostras de sangue utilizando seringas e agulhas descartáveis previamente lavadas com anticoagulante (heparina sódica 5000 U.I./ mL). O sangue foi transferido para micro tubos (2 mL) e centrifugado a 2640 rpm por 10 minutos. O plasma foi então separado e alíquotado em criotubos e posteriormente congelado e mantido em nitrogênio líquido até o momento do seu uso. Amostras de ovários (região cranial, média e caudal), em duplicata, foram fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão PBS 0,05M pH 7,2) por 24 horas e então estocados em PBS (fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico, 0,05 M, pH 7,2) a 4°C até serem processadas para análise histológica.

Tabela 1. Coletas e tempos de cada coleta

Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5
Antes da indução hormonal (AIH) 23 /10/ 2014	Pós desova (0 DPD) 24/10/2014	6 dias pós desova (6 DPD) 30/10/2014	16 dias pós desova (16 DPD) 09/11/2014	30 dias pós desova (30DPD) 23/11/2014

4.6 Avaliação do desempenho reprodutivo

Após a fertilização, os ovos de cada caixa retangular foram coletados e foi determinado o volume da desova. Em seguida, foram colocados 4 mL de ovos em 12 incubadoras cônicas tipo funil de 7L (3 réplicas por unidade experimental). Destes ovos, foram separadas quatro amostras de 0,5 mL, as quais foram fixadas em solução de Karnovsky.

Posteriormente, foi determinado o número de ovos presentes em 0,5 mL de ovos por contagem em Lupa electrónica (Leica M50). Por extrapolação foi determinado a taxa de fecundidade relativa média (TFR = ((número de ovócitos

liberados / peso corporal (g)). Foi considerado como peso corporal, o valor médio obtido das fêmeas que desovaram em uma mesma caixa (item 3.4).

As taxas de fertilização (TF= (percentual de ovócitos fertilizados e viáveis)) e eclosão (TE= (percentual de larvas que eclodirão)) foram estimadas avaliando-se três amostras com aproximadamente 100 ovos de cada incubadora. Para isto, foram usadas as seguintes formulas: TF= número de ovos viáveis / número total de ovos* 100, e TE= Número de larvas antes de eclodir / número total de ovos *100.

4.7 Análise descritiva e estereológica dos ovários:

As amostras de ovários fixadas em solução de Karnovsky (conforme descrito anteriormente) foram incluídas utilizando o Kit de resina (Technovit 7100, Kulzer Histo-Technik), seccionadas com 3 µm de espessura. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina.

Para a análise estereológica dos ovários foi seguida a metodologia aplicada por Criscuolo-Urbinati et al. (2012) com modificações. No presente estudo foram considerados os seguintes tipos de estruturas: ovócito pré vitelogênicos (OPV), ovócito alvéolos corticais (OAC), ovócitos vitelogênicos incompletos (OVI), ovócitos vitelogênicos completos (OVC), ovócitos vitelogênicos completos com quebra da vesícula germinal que não foram ovulados-GVBD (NO), complexos pós ovulatórios (CPO), ovócitos atrésicos (AO) e tecido intersticial (TI). Os artefatos foram raros e não foram incluídos. Foi determinada a frequência de densidade de volume ocupada por cada estrutura mencionada anteriormente. Para tal fim, foram utilizados três campos microscópicos (objetiva 5x) das três regiões dos ovários (9 campos microscópicos por ovário). As contagens foram feitas em um *grid* com 352 pontos. Foram computados os pontos sobre as estruturas mencionadas e calculadas suas frequências (nº pontos / total de pontos* 100).

4.8 Hormônios esteroides:

Os níveis plasmáticos de 17β-estradiol (E₂) e 17α-hidroxiprogesterona (17α-OHP) foram quantificados no plasma pelo método de elisaimunoensaio (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Utilizando kits comerciais (DRG Instruments GmbH, Inc., Frauenbergstraße, Marburg, Germany) e seguindo as

instruções do fabricante. As absorvâncias foram lidas a 450 nm utilizando um leitor de microplacas (Epoch2, Bio teK Instruments, Inc., Highland Park, Winooski, USA). Todas as amostras foram realizadas em duplicata, e a validação dos kits foram determinada através do cálculo da variação inter e intra-ensaio, com as variações menores a 7% para E₂ e 11% para 17 α -OHP.

4.9 Análises estatísticas:

As análises estatísticas foram realizadas com os softwares STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) e Excel (Microsoft, Redmond, USA). Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas ($P < 0,05$), desta forma, os resultados foram expressos em mediana seguidas das amplitudes inter-quartis e valores máximo e mínimo.

4.10 Certificação do trabalho:

Esse trabalho foi certificado e documentado com número de protocolo 5726/15, por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal. A certificação foi adotada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Jaboticabal, SP.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros da qualidade da água

Os valores médios dos parâmetros de qualidade da água, no laboratório, foram de $29,24 \pm 0,42^{\circ}\text{C}$ de temperatura; $7,66 \pm 0,08$ de pH; $5,74 \pm 0,14$ mg/L de O₂ dissolvido; e $182,38 \pm 5,53$ μS de condutividade da água. Estes valores apresentam-se satisfatórios, mantendo-se dentro do padrão recomendado para o cultivo adequado do *A. altiparanae* (Garutti e Britski, 2000).

5.2 Desova:

A indução hormonal dos peixes começou as 21:30 e foi terminada as 21:50 horas. Observou-se que as fêmeas começaram a desovar 5 horas após a indução hormonal, isto é as 2:30 da manhã. A temperatura registrada nesse tempo foi de

28,8°C o que daria 144 horas grau. A última desova foi registrada as 6:45 da manhã, o que daria 259 horas grau.

Segundo as características externas, se determinou que das 32 fêmeas que foram injetadas, 2 não desovaram e 30 desovaram.

5.3 Índice hepatossomático (IHS):

Não se obteve diferenças significativas ($P > 0,05$) para o IHS entre as coletas (Fig. 1.).

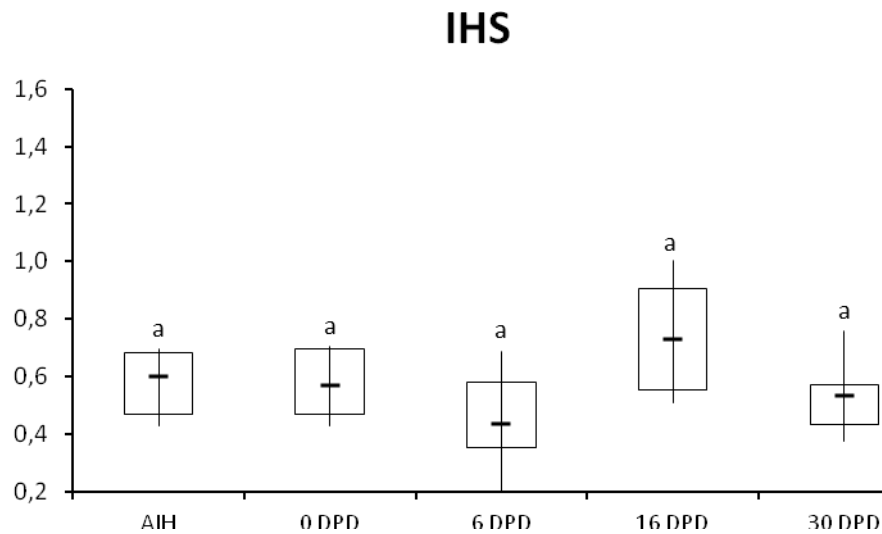


Fig. 1. Índice hepatossomático de fêmeas de *A. altiparanae*, ao longo do tempo. AIH: antes da indução hormonal; 0 DPD: 0 dias pós desova; 6 DPD: 6 dias pós desova; 16 DPD: 16 dias pós desova; 30 DPD: 30 dias pós desova. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Teste Kruskal Wallis, apresenta os valores máximos e mínimos (extremos da linha vertical), valores do 1° e 3° quartil (extremos do retângulo) e a mediana (segmento de reta dentro do retângulo).

5.4 Desempenho reprodutivo:

Após a desova, foi determinado que em 0,5 mL de ovos existe aproximadamente $457,00 \pm 17,47$ ovos. Neste experimento obteve-se 100 mL de ovos, o que daria aproximadamente 91466 ovos no total.

A Taxa de fecundidade relativa foi de $216,71 \pm 56,97$, a taxa de fertilização de $46,76 \pm 15,95$ e a taxa de eclosão $47,67 \pm 19,07$.

5.5 Análise descritiva das estruturas ovarianas:

Neste estudo, consideramos as seguintes estruturas ovarianas para as análises estereológicas (Fig. 2.):

Ovócito Pré vitelogênico (OPV): núcleo central volumoso com numerosos nucléolos esféricos periféricos e citoplasma basófilico.

Ovócito alvéolo cortical (OAC): núcleo central e nucléolos periféricos. Citoplasma basófilo com alvéolos corticais na periferia, eram maiores que os OPV.

Ovócito vitelogênico incompleto (OVI): núcleo central, ainda eram observados os nucléolos periféricos. O volume citoplasmático maior que os AC e com grânulos de vitelo, mas o citoplasma ainda apresentava algumas partes basófilas não constituídas por grânulos de vitelo.

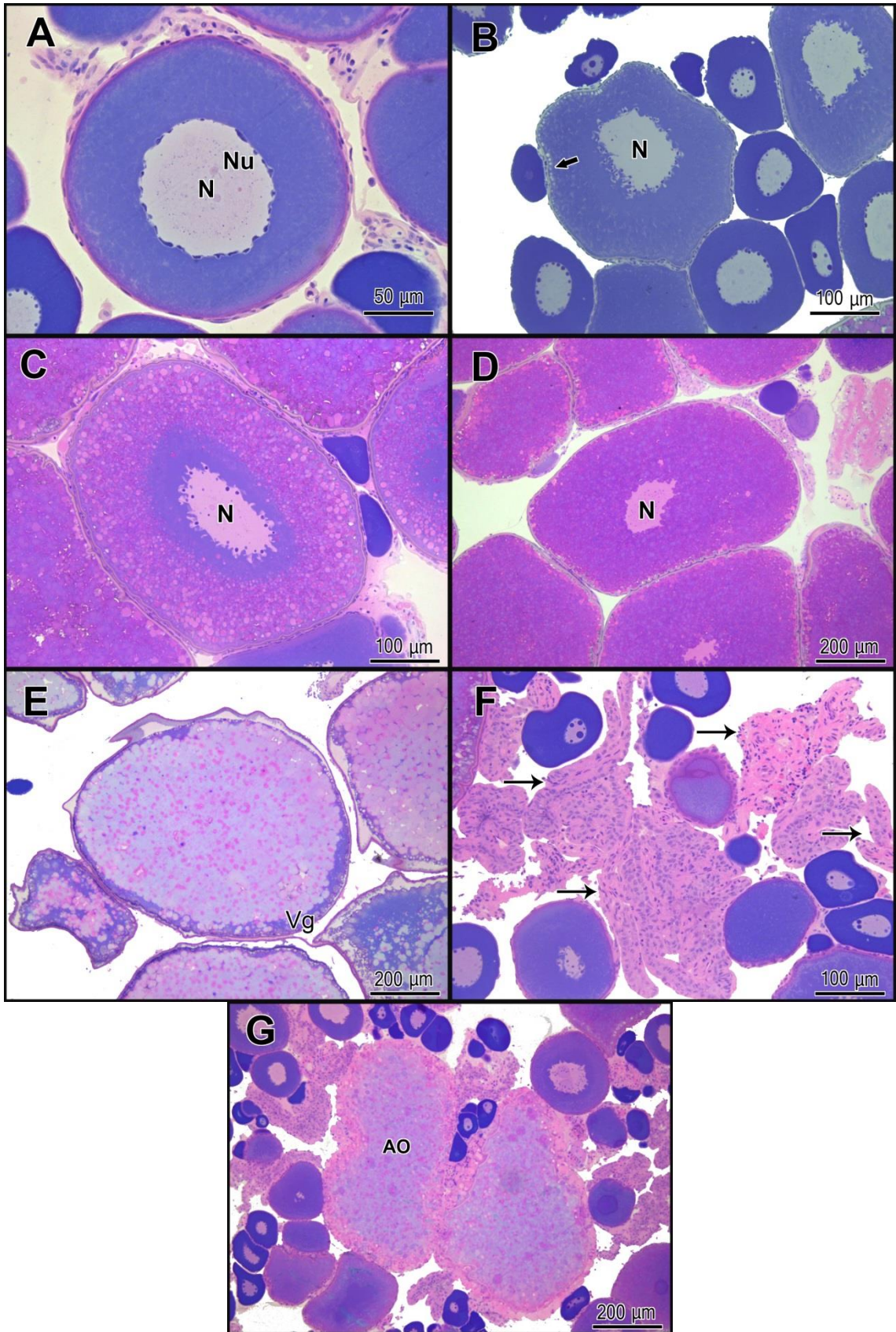
Ovócito vitelogênico completo (OVC): núcleo central ou ligeiramente excêntrico. Citoplasma com aumento de volume e totalmente preenchido com grânulos de vitelo. Não são mais observadas as partes basófilas no citoplasma. Este tipo de ovócito foi observado em todas as coletas e foram considerados como ovócitos maduros.

Vitelogênico com vesícula germinativa migrada e não ovulada (NO): núcleo ausente. Citoplasma preenchido por vesículas de vitelo com aspecto desorganizado e fundidas umas às outras. Presença de espaços periplasmáticos. Na periferia celular se encontrava a vesícula germinativa rompida, mas ovócito permaneceu aderido ao ovário.

Complexos pós ovulatórios (CPO): estrutura remanescente nos ovários, formada pelas camadas das células foliculares e teca, após a ovulação. Estas estruturas eram envelhadas com formato diverso e irregular

Ovócito Atrésico (AO): estas células apresentavam contorno disforme e irregular e estrutura interna desorganizada. Os grânulos de vitelo têm aspecto irregular, formando uma massa amorfa. Algumas vezes muito similar aos CPOs, mas quando bem observadas apresentam grânulos de vitelo.

Fig. 1. Classificação das estruturas ovarianas. Fotomicrografias de secções histológicas de ovário de *A. altiparanae* submetidos a indução hormonal. A: Ovócito pré vitelogênico (OPV); B: Ovócito alvéolo cortical (OAC); C: Ovócito vitelogênico incompleto (OVI); D: Ovócito vitelogênico completo (OVC); E: Vitelogênico com vesícula germinativa migrada e não ovulada (GVBD) (NO); F: Complexos pós-ovulatórios (CPO); G: Ovócito atrésico (AO). Destacados: núcleo (N); nucléolos (Nu); alvéolos corticais (seta espessa); vesícula germinativa rompida na periferia da célula (Vg); estrutura remanescente formada pelas camadas foliculares e teca (CPO) (setas delgadas). Coloração com Hematoxilina – eosina.



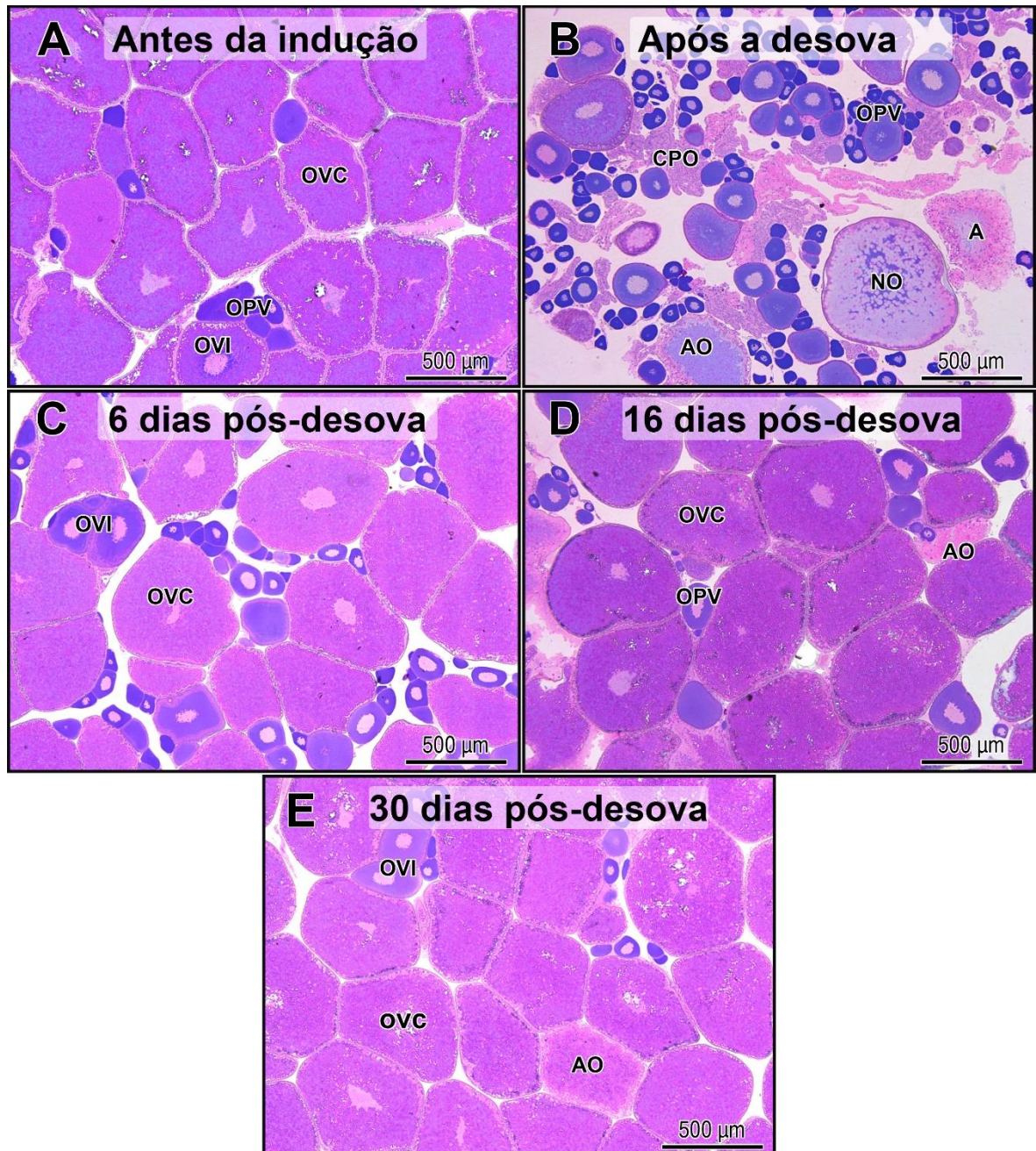


Fig. 2. Fotomicrografias de secções histológicas de ovário de *A. altiparanae*. A: Coleta 1, antes da indução hormonal; B: Coleta 2, pós desova; C: Coleta 3, 6 dias pós desova; D: Coleta 4, 16 dias pós desova; E: Coleta 5, 30 dias pós desova. Objetiva de 5X. Coloração com Hematoxilina – eosina.

5.6 Densidade de volume das estruturas ovarianas entre coletas:

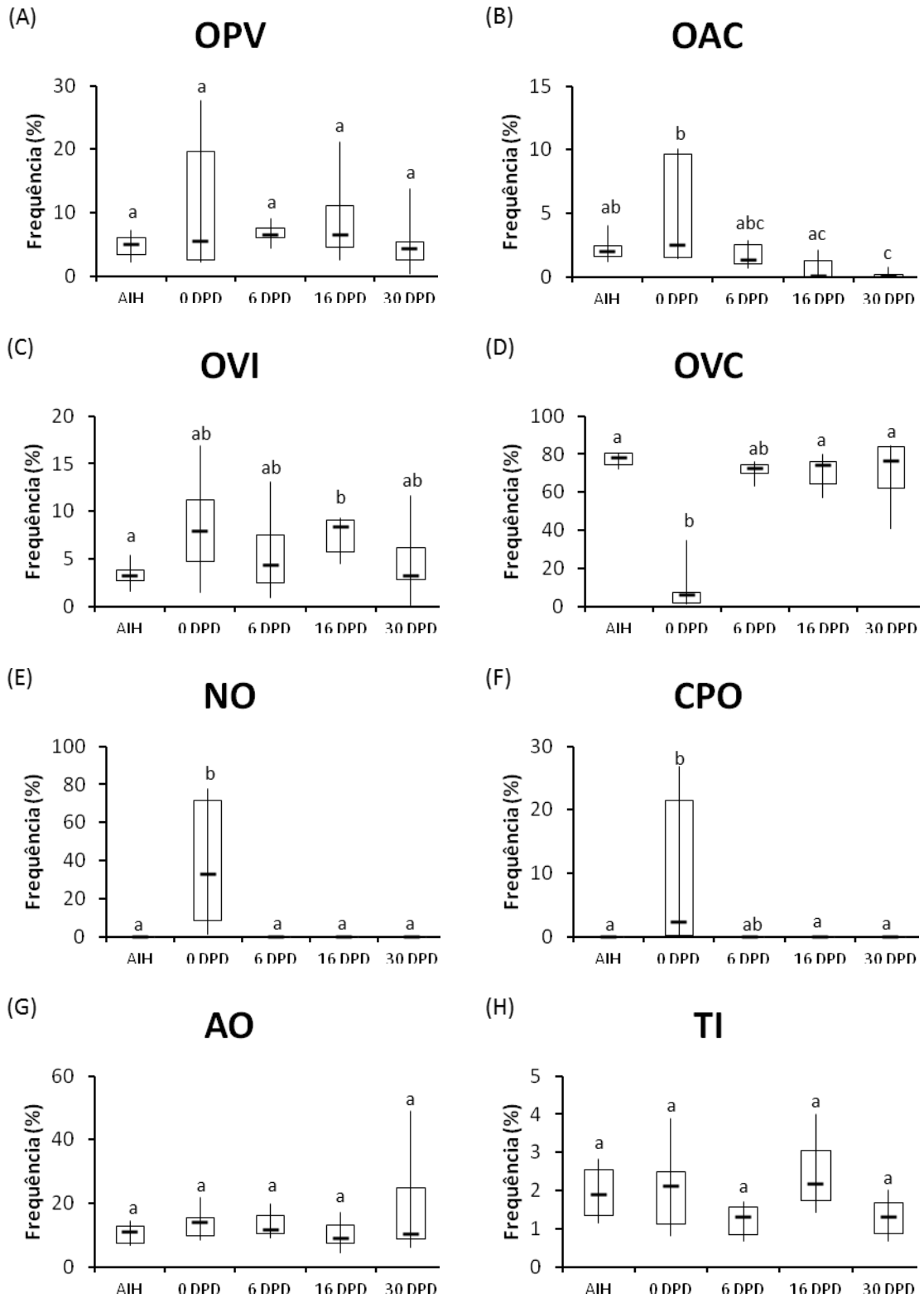
De modo geral, na coleta 1, antes da indução hormonal, predominavam OVC, também continham OPV, OVI e AO. Característica de fêmeas em maturação avançada. (Fig. 3A). Na coleta 2, após a desova, predominavam OPV e CPO encontraram-se também OAC, OVC, AO e NO. Foi observado muito espaço entre estruturas. Característica de fêmeas que desovaram (Fig. 3B). Na coleta 3, 6 dias pós desova, predominavam OVC, porém tinha também uma frequência relativamente alta de OPV e OVI, também foi observado alguns AO. Característica de fêmeas em maturação intermediária/avançada (Fig. 3C). Na coleta 4, 16 dias pós desova, predominavam OVC e diminuiu a quantidade de OPV. Observou-se também alguns OVI e AO. A aparência era similar aos ovários das fêmeas de AIH. Característica de fêmeas em maturação avançada (Fig. 3D). Na coleta 5, 30 dias pós desova, predominavam OVC, com uma frequência relativamente baixa de OPV, OVI e AO, similar ao que foi observado nos ovários das fêmeas em AIH e 16 DPD. Característica de fêmeas em maturação avançada (fig. 3E).

Com relação a frequência de densidade de volume das estruturas observadas, a mediana das frequências de OPV, AO, TI foram similares ao longo das coletas ($P > 0,05$) e sempre inferiores a 20% (Fig. 4A, G e H respectivamente). A mediana da frequência de OAC foi similar ao longo dos primeiros períodos de análise (AIH (2,00), 0 DPD (2,48) e 6DPD (1,33)), mas o valor em 0 DPD foi superior aos valores dos últimos períodos de análise (16 DPD (0,03) e 30DPD (0,06)) ($P < 0,05$) (Fig. 4B). A mediana da frequência de OAC em AIH (2,00) também foi superior a de 30 DPD (0,06) (Fig. 4B).

Com relação aos ovócitos vitelogênicos, as medianas das frequências de OVI foram similares ao longo das coletas, exceto pelos valores superiores em 16 DPD (8,30) em relação a AIH (3,19) (Fig. 4C). Com relação aos OVC e NO e aos CPO observamos marcantes variações no período 0DPD (Fig. 4D, E, F). Os valores da mediana de OVC em 0DPD (6,23) foram inferiores a AIH (78,22), 16 DPD (74,15) e 30 DPD (76,52) (Fig. 3 e Fig. 4D). Para NO os valores da mediana de 0DPD (32,88) foram superiores à todos os demais períodos (Fig. 4E). Para

CPO os valores da mediana de 0DPD (2,32) foram similares a de 6DPD (0,00), mas superiores a todos os outros períodos (Fig. 4F).

Fig. 2. Comparação das frequências das estruturas ovarianas (%) de *A. altiparanae* nos diferentes tempos experimentais. A: Ovócito pré vitelogênicos (OPV); B: Ovócito alvéolo cortical (OAC); C: Ovócitos vitelogênicos incompletos (OVI); D: Ovócitos vitelogênicos completos (OVC); E: Ovócitos vitelogênicos completos com vesícula germinativa migrada e não ovulada (NO); F: Complexos pós ovulatórios (CPO); G: Ovócitos atrésicos (AO); H: Tecido intersticial (TI). Letras diferentes indicam diferença significativas ($P < 0,05$). Teste Kruskal Wallis, apresenta os valores máximos e mínimos (extremos da linha vertical), valores do 1° e 3° quartil (extremos do retângulo) e a mediana (segmento de reta dentro do retângulo).



5.7 Concentração plasmática dos esteróides gonadais:

Os valores da mediana de E₂ e 17 α-OHP foram similares ao longo dos períodos de análises (Fig. 5A e 5B). Observamos apenas valores das medianas superiores de E₂ e 17 α-OHP em 6 DPD (1,37 e 3,83) comparado respectivamente com AIH (0,59 e 2,70) (Fig. 4A) e 30 DPD (0,91 e 1,37) (Fig. 5 A e B)

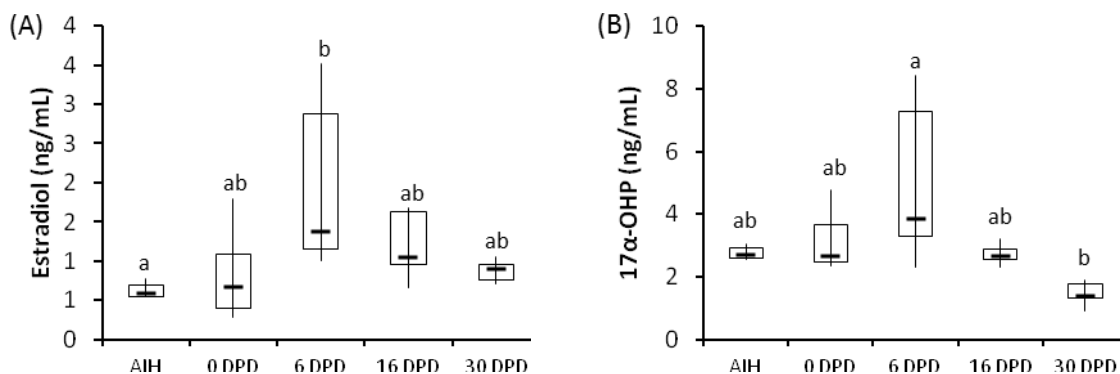


Fig. 3. Níveis plasmáticos de E₂ e 17 α-OHP (ng /mL), em *A. altiparanae* nas coletas. AIH: antes da indução hormonal; 0 DPD: 0 dias pós desova; 6 DPD: 6 dias pós desova; 16 DPD: 16 dias pós desova; 30 DPD: 30 dias pós desova. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Teste Kruskal Wallis, apresenta os valores máximos e mínimos (extremos da linha vertical), valores do 1° e 3° quartil (extremos do retângulo) e a mediana (segmento de reta dentro do retângulo).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo demonstramos de forma inédita que fêmeas de lambari (*A. altiparanae*) mantidas em laboratório possivelmente podem ser submetidas à desova sucessiva se mantidas à temperatura de $29,24 \pm 0,42^\circ\text{C}$ em sistema de recirculação fechado. As fêmeas se mostraram aptas a uma segunda indução hormonal seis dias após a primeira. Estes achados destacam ainda mais o potencial do lambari para a piscicultura, pois já havia sido demonstrado que a espécie pode ser manipulada para ter seus ovários maduros fora da época reprodutiva (Evangelista, 2015) e agora demonstramos que a mesma fêmea possivelmente pode ser submetida à desova sucessiva se mantida em laboratório a temperatura de $29,24 \pm 0,42^\circ\text{C}$.

Um aspecto surpreendente observado neste estudo foi o curto intervalo de 6 dias entre a desova e a maturação completa dos ovários. Desovas sucessivas em cativeiro já foram reportadas para outras espécies de peixe de água doce e normalmente o intervalo entre as desovas é mais longo, como por exemplo, para a “tilápia” *Oreochromis niloticus* (cada 30-40 dias, Lazard et al., 1996) e “Apaiari” *Astronotus ocellatus* (3-4 vezes por ano, Silva et al., 1993). No entanto, curtos intervalos para peixes mantidos em cativeiro são comumente descritos para espécies marinhas, tais como, “amber jack” *Seriola dumerili* (2 vezes seguidas em 3 dias, Mylonas et al., 2004), o “black sea bass” *Centropristis striata* (4 vezes em 7 dias, Watanabe et al., 2003) e “dusky grouper” *Epinephelus marginatus* (7 vezes em 10 dias, Marino et al., 2003). O período relativamente curto aqui descrito para o *A. altiparanae* em condições controladas pode ser explicado pela rápida elevação dos níveis de E₂ entre o momento da desova e 6 DPD. O E₂ estimula a síntese de vitelogenina no fígado de peixes teleósteos (Gazola e Borella, 1997; Miura et al., 2007; Nagahama e Yamashita 2008; Lubzens et al., 2010; Arantes et al., 2010; Nelson e Habibi, 2013)

Outro aspecto importante associado ao curto período vitelogênico foi o rápido processo de absorção dos CPO. A densidade de volume ocupada por CPOs reduziu de 20% para 0% entre 0DPD e 6DPD (Fig. 3), processo este que pode estar associado à disponibilização de condições para o concomitante desenvolvimento de ovócitos OPV e OAC para uma segunda desova. Após a desova, seja em ambiente natural ou em cativeiro, os ovários se regeneram e ocorre uma nova maturação de ovócitos para a próxima desova. A duração deste processo varia com a espécie, além de fatores externos como nutrição, características ambientais e temperatura (Fitzhugh e Hettler 1995; Drummond et al., 2000; Kaptaner e Ünal, 2006; Gantias et al., 2007; Gantias, 2012; Grier, 2012). Neste estudo observamos que o tempo de reabsorção dos CPO para o *A. altiparanae* foi de 6 dias. Em uma espécie congênere do *A. altiparanae*, o *A. bimaculatus lacustris* também foi encontrado uma redução significativa de CPO quatro dias pós desova (Drummond et al., 2000). Smith e Haley (1987) observaram que em *Oreochromis mossambicus* a partir do 5DPD os CPOs são dificilmente observados. Wang et al. (2014) determinou que em *Hemiculter leucisculus* após 48 horas os CPOs estavam em processo final de reabsorção.

Todas as espécies antes mencionadas apresentam desova parcelada, o que sugere que em peixes com desova parcelada aparentemente a absorção de CPO é rápida (Fitzhugh e Hettler 1995; Kaptaner e Ünal, 2006; Gancias, 2012) e pode, portanto, estar associada com a necessidade de propiciar rapidamente condições para o desenvolvimento de um novo grupo de ovócitos vitelogênicos.

Em peixes, os ovócitos aumentam de volume pela acumulação de vitelo dentro do citoplasma (Hiramatsu et al., 2015), portanto, quanto maior a frequência e volume dos OVC maior será o ovário e a fêmea será considerada apta à desova (Hainfellner et al., 2012; Pereira et al., 2013, Quagio-Grassiotto et al., 2013). Isto porque ao final da vitelogênese, os ovócitos tornam-se células relativamente grandes com cerca de 1mm (em espécies tropicais), as quais contêm todas as informações do mRNAs materno, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas e hormônios, as quais são necessárias para o desenvolvimento do embrião (Lubzens et al., 2010). Neste contexto, não observamos variações significativas na densidade de volume dos ovócitos vitelogênicos entre 6 e 30 DPD (Fig. 3), sugerindo que as fêmeas poderiam ser induzidas a qualquer tempo ao longo deste período.

No entanto, se por um lado, a densidade de volume ocupada pelos ovócitos vitelogênicos nos ovários de *A. altiparanae* foi similar entre 6 e 30 DPD, é possível que ao longo deste período estas células apresentem diferentes níveis de maturação que não podem ser detectados pelas técnicas aqui empregadas. É possível que o volume individual dos ovócitos vitelogênicos tenha aumentado gradativamente entre 6 e 30 DPD. Neste contexto, foi demonstrado que em algumas espécies ovócitos maiores produzem larvas com maiores chances de sobrevivência (Tamada e Iwata 2005; Iguchi 2012). É possível também que estas células expressem mais ou menos receptores de gonadotrofinas e esteroides gonadais (Nagahama e Yamashita, 2008; Levavi-Sivan et al., 2010; Lubzens et al., 2010; Mylonas et al., 2010; Zohar et al., 2010; Yaron e Levavi-Sivan, 2011) ao longo do tempo. Mas, por outro lado, os níveis de 17α -OHP, precursor do $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), principal indutor da maturação dos ovócitos e ovulação em peixes (Nagahama e Yamashita, 2008; Tokarz, et al., 2015) reduziu entre 6 e 30 DPD sugerindo no primeiro tempo um potencial mais evidente para uma segunda desova. Assim, dado o ineditismo dos achados e a

escassez de informações sobre o tema, o tempo ideal para uma segunda indução hormonal precisaria ser estabelecido com base em futuras abordagens que levem em consideração todas as variáveis mencionadas.

No nosso conhecimento, este é o primeiro relato de potencial para desova sucessiva da mesma fêmea de lambari (*A. altiparanae*) mantidas em laboratório à temperatura de $29,24 \pm 0,42^{\circ}\text{C}$ em sistema de recirculação fechado, já que foi demonstrado que existe um curto intervalo, de 6 dias, entre a desova e a maturação completa dos ovários e que as fêmeas se mostraram aptas a uma segunda indução hormonal seis dias após a primeira. A possibilidade de uso sucessivo de uma mesma fêmea e o rápido tempo para um novo amadurecimento dos ovários (6 dias) pode abrir uma mudança de paradigma na produção desta espécie, pois as fêmeas podem ser mantidas em laboratório durante todo o seu ciclo reprodutivo, podendo ser induzidas à desova o ano todo, além do mais, reduziria a demanda por espaço, água e custos com mão de obra para a manutenção e seleção de grandes plantéis de reprodutores, tornando a produção desta espécie nativa ainda mais adequada de acordo com os preceitos de sustentabilidade atrelados à uma aquicultura moderna e competitiva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, C.A., Molinari, S.L., Agostinho, A.A., Verani, J.R., 1984. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambarí, *Astyanax bimaculatus* (L.) (Osteichthyes- Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. Rev. Bras. Biol. 44(1), 31-36.
- 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. Anim. Reprod. Sci. 118, 330-336.
- Bezerra, R., De Oliveira, R., Maggioni, R., Lima, D., Orian, J., 2012. Possibilidades da exploração comercial de peixes reofilicos em cativeiro: Uma revisão. Rev. Bras. Hig. Sanid. Anim. 2. 6, 92-114.

- Chehade, C.H., Cassel, M., Borella, I., 2015. Induced reproduction in a migratory teleost species by wáter level drawdown. *Neotrop. Ichthyol.* 13(1), 205-212.
- Criscuolo-Urbinati, E., Kuradomi, R.Y., Urbinati, E.C., Batlouni, S.R., 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology* 78(9), 2087-2094.
- Drummond, C.D., Bazzoli, N., Rizzo, E., Sato, Y., 2000. Postovulatory follicle: A model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. *J. Exp. Zool. B.* 287, 176-182.
- Evangelista, M.M., 2015. Manipulação de horas de luz e temperatura da água na reprodução induzida de *Astyanax altiparanae* durante o inverno. Dissertação de Mestrado, Instituto de pesca, São Paulo. 49 pp.
- Fitzhugh, G.R., Hettler, W.F., 1995. Temperature influence on postovulatory follicle degeneration in Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*. *Fish B-Noaa.* 93, 568-572.
- Fontenele, O., 1948. Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), em cativo (Actinopterygii, Osteoglossidae). *Rev. Bras. Biol.* 8, 445-459.
- Garutti, V., Britski, H.A., 2000. Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Sér. Zool.* 13, 65-88.
- Ganias, K., Nunes, C., Stratoudakis, Y., 2007. Degeneration of postovulatory follicles in the Iberian sardine, *Sardina pilchardus*: structural changes and factors affecting resorption. *Fish. B-Noaa.* 105, 131-139.
- Ganias, K., 2012. Thirty years of using the postovulatory follicles method: overview, problems and alternatives. *Fish. Res.* 117-118, 63-74.
- Gazola, R., Borella, M.I., 1997. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 1485-1487.

- Godinho, H.P., 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 13 (3), 351-360.
- Godinho, A.L., Lamas, I.R., Godinho, H.P., 2010. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. *Environ. Biol. Fish.* 87, 143-162.
- Gomes, C.C., Costa, F.G., Borella, M.I., 2013. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). *Micron* 52-53, 33-38.
- Grier, H.J., 2012. Development of the follicle complex and oocyte staging in red drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). *J. Morphol.* 273(8), 801-829.
- Hainfellner, P., Gonçalves, T., Moreira, R.G., Nakaghi, L.S.O., Batlouni, S.R., 2012. Gonadal steroids levels and vitellogenesis in the formation of oocytes in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Teleostei: Characiformes). *Neotrop. Ichthyol.* 10(3), 601-612.
- Hiramatsu, N., Todo, T., Sullivan, C.V., Schilling, J., Reading, B.J., Matsubara, T., Yong Woon, R., Mizuta, H., Luo, W., Nishimiya, O., Wu, M., Mushirobira, Y., Yilmaz, O., Hara, A., 2015. Ovarian yolk formation in fishes: Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 221, 9-15.
- Iguchi, K., 2012. Larger eggs at lower water temperature as a measure to assure effective hatching size in the landlocked form of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Ichthyol. Res.* 59, 20–25.
- Kaptaner, B., Ünal, G., 2006. Apoptosis in Postovulatory Follicles of *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 23 (3-4), 263–267.
- Lazard, J., Legendre, M., 1996. The spontaneous reproduction of Tilapia: an opportunity or handicarp for the development of African aquaculture?. In: Pullin, R.S.V., Lazard, J., Legendre, M., Amon Kothias, J.B., Pauly, D. (Eds.), *The third international symposium on tilapia in aquaculture*, pp. 77-91.

- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E.L., Gómez, A., Lareyre, J.J., 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen. Comp. Endocr.* 165(3), 412-437.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367-389.
- Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M.G., Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture* 219, 841-858.
- Miura, C., Higashin, T., Miura, T., 2007. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. *Biol. Reprod.* 77, 822-828.
- MPA, 2011. Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2011. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília.
- Mylonas, C.C., Papandroulakis, N., Smboukis, A., Papadaki, M., Divanach, P., 2004. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. *Aquaculture* 237, 141-154.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocr.* 165, 516-534.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev. Growth Differ.* 50, 195-219.
- Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen. Comp. Endocr.* 192, 15–24.
- Ozório, R.O.A., Avnimelech, Y., Castagnolli, N., 2004. Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. In: Possebon, J.E., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*, TecArt, São Paulo, pp. 7-24.
- Pereira, T.S.B., Moreira, R.G., Batlouni, S.R., 2013. Dynamics of ovarian maturation during the reproductive cycle of *Metynnis maculatus*, a reservoir

- invasive fish species (Teleostei: Characiformes). *Neotrop. Ichthyol.* 11(4), 821-830.
- Porto-Foresti, F., Castilho-Almeida, R.B., Senhorini, J.A., Foresti, F., 2010. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies Nativas para piscicultura no Brasil*. 2da edição, Editoraufsm, Santa Maria, RS, pp.101-115.
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Foresti, F., Castilho-Almeida, R.B., 2001. Cultivo do lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. *Panorama da Aqüicultura* 11, 15-19.
- Quagio-Grassiotto, I., Wildner, D.D., Ishiba, R., 2013. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 37(2), 181-191.
- Santana, C.A., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R., Yukimitu, K., Moraes, J.C.S., Lima, S.M., 2015. Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy applied in fish scales to access environmental integrity: A case study of *Astyanax altiparanae* species. *Infrared Phys. Techn.* 72, 84-89.
- Sato, Y., Sampaio, E.V., Fenerich-Verani, N., Verani, J.R., 2006. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 23(1), 267-273.
- Silva, J.W.B., Regis, R.C., Bezerra, A.T., 1993. Produção de alevinos de apaiari, *Astronotus ocellatus ocellatus* (Cuvier, 1829) Swainson, 1839, em viveiros. *Ciênc Agron. Fortaleza* 24, 22-26.
- Silva, N.J.R., Lopes, M.C., Fernandes, J.B.K., Henriques, M.B., 2011. Caracterização dos sistemas de criação e da cadeia produtiva do lambari no estado de São Paulo, Brasil. *Informações Econômicas, São Paulo*, 41(9), 17-28.
- Smith, C.J., Haley, S.R., 1987. Evidence of steroidogenesis in postovulatory follicles of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Cell. Tissue Res.* 247, 675-687.

- Suzuki, H.I., Bulla, C.K., Agostinho, A.A., 2005. Estratégias reprodutivas de assembléias de peixes em reservatórios In: Rodrigues, L., Thomaz, S.M., Agostinho, A.A., Gomes, L.C. (Eds.), Biocenoses em reservatórios padrões espaciais e temporais. RiMa, São Carlos, pp. 223-236.
- Tamada, K., Iwata, K., 2005. Intra-specific variations of egg size, clutch size and larval survival related to maternal size in amphidromous *Rhinogobius goby*. Environ. Biol. Fish. 73, 379-389.
- Tokarz, J., Moller, G., Hrabe, M., Adamski, J., 2015. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. Steroids 103, 123-144.
- Turner, G.F., Robinson, R.L., 2000. Reproductive biology, mating systems and parental care In: Beveridge, M.C.M., McAndrew, B.J. (Eds.), Tilapias: biology and exploitation. Kluwer Academic Publishers, London 25, 33-58.
- Vazzoler, A.E.A.M., 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteros: teoria e prática. EDUEM, Maringá, São Paulo. 169 pp.
- Wang, T., Huang, Shen, J., Chen, Y., Sun, G., Wang, H., 2014. Batch fecundity and spawning frequency of invasive *Hemiculter leucisculus* (Basilewsky, 1855) in Erhai Lake, China. Environ. Biol. Fish. 97, 1161–1168.
- Watanabe, W.O., Smith, T.I.J., Berlinssky, D.L., Woolridge, C.A., Stuart, K.R., Copeland, K.A., Denson, M.R., 2003. Volitional spawning of black sea bass *centropristis striata* induced with pellet luteinizing hormone releasing hormone-analogue. J. World Aquacult. Soc. 34, 319-331.
- Weber, A.A., Pereira, F., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2012. Oocyte adhesiveness and embryonic development of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces:Characidae). Zygote 21(2), 198-202.
- Woynarovich, E., Horvath, L., 1983. The artificial propagation of warm-water finfishes-A manual for extension. Traduzido por Chama, Escopo, Brasília. 220 pp.
- Yaron, Z., Levavi-Sivan, B., 2011. Endocrine Regulation of Fish Reproduction In: Farrell, A.P. (Eds.), Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment. San Diego 2, 1500–1508.

Zaniboni – Filho, E., Weingartner, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31(3), 367-373.

Zohar, Y., Cueto, J.A.M., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocr.* 165(3), 438-455.