



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA

Campus de Jaboticabal



**Ciclo reprodutivo e indução hormonal de fêmeas de
mapará (*Hypophthalmus marginatus*) no baixo Rio
Tocantins, à jusante da barragem de Tucuruí**

Patrick Hainfellner
Zootecnista

Jaboticabal – São Paulo

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA

Campus de Jaboticabal



**Ciclo reprodutivo e indução hormonal de fêmeas de
mapará (*Hypophthalmus marginatus*) no baixo Rio
Tocantins, à jusante da barragem de Tucuruí**

Patrick Hainfellner

Orientador: Dr. Sergio Ricardo Batlouni

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 Doutor em Aquicultura.

Jaboticabal – São Paulo

2015

Hainfellner, Patrick
H153c Ciclo reprodutivo e indução hormonal de fêmeas de mapará
(*Hypophthalmus marginatus*) no baixo Rio Tocantins, à jusante da
barragem de Tucuruí / Patrick Hainfellner. – – Jaboticabal, 2015
xii, 88 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2015

Orientador: Sergio Ricardo Batlouni

Banca examinadora: Laura Satiko Okada Nakaghi, Maria Inês
Borella, Wagner Cotroni Valenti, Luís David Murgas

Bibliografia

1. *Hypophthalmus marginatus*. 2. Ciclo reprodutivo. 3. Esteroides
gonadais. 4. Indução hormonal. 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.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

Dedico aos meus pais, Rosa Satiko Yaegashi Hainfellner e Carlos Horst Hainfellner (in memóiriam), como agradecimento por todas as ferramentas dadas com sacrifício para eu alcançar meus objetivos. Mãe, obrigado por ter me ensinado a ser uma pessoa responsável, Pai obrigado por ter me mostrado como ser uma pessoa boa e que todo problema tem sua solução, só precisa da ferramenta certa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Sergio Ricardo Batlouni, pela orientação e amizade. Obrigado pelos cafés, chás, cervejas, horas de discussão, confiança, paciência, muitas rizadas, destes últimos 6 anos em que nossas vidas tiveram tantas mudanças.

Aos companheiros, parceiros de vida e de laboratório, Daniel (China), Guilherme (Guidjerme), Rafael (Jack), Roosevelt (Roozzzevelt), Thiago (Gordo), Valéria (Apestosa), sem eles tudo seria mais difícil e menos engraçado!

Em especial a minha companheira, amiga e namorada Melanie Digmayer, por sempre me escutar, apoiar, cuidar, perdoar e principalmente Amar ! Te amo !

Ao Histotécnico Orandi Mateus, do Laboratório de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV-UNESP Jaboticabal), por todo conhecimento passado.

Ao Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp em Jaboticabal, pela ajuda oferecida pela Maria Lucília M da Costa.

A todos os amigos que fiz durante essa jornada e outros que vem me acompanhando a longa data, em especial o Flávio Cese Arantes com a preciosa ajuda com a estatística.

À Prof^a. Renata Guimarães Moreira e equipe pelo apoio durante as análises, sugestões e disponibilidade da estrutura laboratorial.

Ao Instituto Federal do Pará (IFPA), campus de Tucuruí, por todo apoio durante todas as coletas, em especial Prof. Luciano Domingues Queiroz, Prof. Ari José Arimilton Carvalho de Andrade e aluno de graduação Bruno Alves Nogueira.

À Prof^a. Dra. Rossineide Martins da Rocha, da Universidade Federal do Pará, Campus de Belém e alunos de mestrado Liziane Amaral Barbosa e graduação Manoel Alessandro Aviz Borges, pelo apoio nas coletas.

Ao Prof. Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti, do CAUNESP, Universidade Estadual Paulista – UNESP, por todo conhecimento compartilhado, apoio e valiosas correções na montagem e desenvolvimento do Projeto.

A todos os pesquisadores e profissionais envolvidos no projeto: Profa. Dra. Alessandra da Silva Augusto – UNESP - Campus Experimental do Litoral Paulista; Profa. Dra. Andréa Tucci - Núcleo de Pesquisa em Ficologia - Instituto de Botânica – SP; Prof. Dr. Bruno de Lima Preto – IFES – Campus de Alegre, ES; Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini – FC, CAUNESP- UNESP; Profa. Dra. Cristiana Ramalho Maciel – Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, Pará; Prof. Dr Edilson Matos - Universidade Federal Rural da Amazônia; Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini-Vicentini – FC, CAUNESP– UNESP; Profa. Dra. Janaina Mitsue Kimpara – IFES – Campus de Piúma, ES; Profa. Dra. Patrícia M. C. Moraes Valenti –UNISA, São Paulo, SP; Prof. Dr. Prof. Roberto Goitein - Unesp, Rio Claro.

To Prof. Wei Ge (葛偉) and his lab for receiving and providing all the support need for my PhD internship. We managed to get all the results need in a very short period and the most important gave me a unique experience which I could get great friends as a result, Wong Wing Lei (王穎妮) Queenie, Chen Weiting (陳偉庭), Fan Yuqin (范玉琴), Lu Huijie (魯慧杰) Angel, Zhang Zhiwei (張志偉), Choi Yung Ching (蔡容青) Cherry, Fong Hei Tong (馮曦彤) Ceci, Zhang Yibo (張逸波), Hu Zhe (胡哲), Qin Mingming (秦明鳴) May.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura e ao Centro de Aqüicultura da Unesp (CAUNESP), através de seus docentes e funcionários (faxineiras, motorista, jardineiro, administrativos e outros), por possibilitarem a realização deste trabalho, em especial Mauro Dias, Valdecir F. de Lima, Silvia R. L. de Laurentiz, David O. Lorente, Fátima A. B. Braga e Mayara V. Vidal e Veralice Cappatto.

À UNESP – Campus de Jaboticabal – FCAV, pelo empréstimo do caminhão para tentativa de transporte dos Maparás.

Ao Centro de Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais de Pirassununga pela cooperação e empréstimo de materiais

À ELETRONORTE por ceder o uso do Porto montante e acesso a jusante da Usina Hidroelétrica de Tucuruí.

Aos Maparás que cederam suas vidas para um bem maior.

À Sorte, que nos permitiu algumas vezes descansar e ao Azar que nos deixou mais preparados para os imprevistos.

*Finalmente a todos que não pude citar, mas que de alguma maneira contribuíram para concretização deste trabalho... **Muito Obrigado!***

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Auxílios a Pesquisa, Processo n° 2010/51271-6.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Bolsa de Doutorado, Processo n° 2011/18734-5.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Bolsa de Doutorado, Processo n° 140959/2011-4.

SUMÁRIO

<i>Resumo Geral</i>	7
<i>Abstract</i>	9
<i>Introdução Geral</i>	11
<i>Referências</i>	20
MANUSCRITO I	24
<i>Resumo</i>	25
<i>Abstract</i>	26
<i>Introdução</i>	27
<i>Material e Métodos</i>	29
<i>Resultados</i>	36
<i>Discussão</i>	39
<i>Referências</i>	48
MANUSCRITO II	64
<i>Resumo</i>	65
<i>Abstract</i>	66
<i>Introdução</i>	67
<i>Material e Métodos</i>	70
<i>Resultados</i>	78
<i>Discussão</i>	80
<i>Referências</i>	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
Ct	Comprimento total
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CS	CIOSIN(Prostaglandina sintética)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EP	Erro padrão
E ₂	17 β -estradiol
<i>efla</i>	Gene do Fator de alongação 1 Alfa
EBHC	Extrato Bruto de Hipófise de Carpa
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
<i>fshb</i>	Gene da Subunidade Beta do Hormônio Folículo Estimulante
g	Gramas (peso)
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
h	Horas
IHS	Índice Hepatosomático
IGS	Índice Gonadosomático
IVS	Índice Viscerosomático
kg	Quilograma

L	Litros
LH	Hormônio Luteinizante
<i>lhb</i>	Gene da Subunidade Beta do Hormônio Luteinizante
M	Mol
m	Metros
mm	Milímetros
min	Minutos
MIS	17 α - 20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona
mL	Mililitro
mg	Miligrama
Mt	Massa total
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	PCR Quantitativo em Tempo Real
μ m	Micrometro
μ L	Microlitro
V	Volts
11-KT	11 Cetotestosterona
17 α -OHP	17 α -Hidroxiprogesterona
20 β -HSD	20 β -hidroxi-esteróide-desidrogenase

RESUMO GERAL

Este estudo é parte de uma proposta mais abrangente intitulada “Cultivo do mapará e do camarão-da-amazônia em sistemas multiespaciais e multitróficos”. Esta proposta é uma parceria entre o Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Empresa Vale do Rio Doce (Parceria para Inovação Tecnológica - PITE). Na proposta inicial, mais abrangente e com diversos outros pesquisadores envolvidos, estavam previstas a execução de três subprojetos que tinham como objetivo final desenvolver conhecimento e tecnologia para desenvolver sistemas sustentáveis para a produção aquícola de mapará e do camarão-da-amazônia com uma abordagem ecossistêmica. Assim, a este estudo coube realizar, inicialmente, as primeiras tentativas de domesticar e transportar o mapará para viveiros de reprodutores localizados no CAUNESP. Por se tratar de uma proposta inédita de bioprospecção não era possível prever a resposta do mapará frente às tentativas de domesticá-lo, pois mesmo sendo intensamente explorado, não existia sequer uma única informação sobre seu cultivo. A espécie se mostrou extremamente sensível ao manejo, o que nos fez tentar substituir o transporte de reprodutores por tentativas de indução à desova de matrizes selvagens nos locais de desova (sendo este um dos temas desta tese desde o início). Assim, neste estudo, focamos em dois principais objetivos: o ciclo reprodutivo da espécie (manuscrito I) e a padronização de um protocolo para sua desova induzida (manuscrito II). Esta tese é então composta por dois manuscritos, sendo que o primeiro gerou informações para a execução do segundo. A escassez de informações e o problema com barragens na região do estudo nos levou a permear assuntos, necessários, mas não antes previstos, como a interrupção de rotas migratórias, o impacto da barragem sobre a população do mapará e sobre sua biologia reprodutiva. Como resultados, observamos que a espécie apresenta particularidades reprodutivas, pois apesar de ter um ciclo reprodutivo similar aos dos peixes de desova total, quando submetida aos processos de desova induzida, apresenta perfil hormonal similar

aos peixes de desova parcelada. Estas características dificultaram o estabelecimento de protocolos de desova bem sucedidos. Concluindo, a espécie apresenta elevada sensibilidade ao manejo e particularidades reprodutivas, as quais tornam incertas a sua domesticação e reprodução em cativeiro. Neste estudo apresentamos alguns resultados favoráveis sobre a reprodução induzida da espécie, mas que ainda não permitem definir se a mesma pode ser incluída no rol de espécies com potencial para serem aproveitadas pela a aquicultura nacional.

Palavras-chave: mapará, ciclo reprodutivo, extrato bruto de hipófise de carpa, esteroides gonadais, expressão gênica.

ABSTRACT

This study is part of a broader proposal entitled "Culture of mapará and Amazon shrimp in multiespaciais and multitrophic systems." This proposal is a partnership between the Aquaculture Center of the São Paulo State University (CAUNESP), the Foundation for Research of the State of São Paulo and Company of Vale do Rio Doce (Partnership for Technological Innovation - PITE). In the original proposal, broader and with several other researchers involved it was planned to execute three subprojects, that had the main objective to develop knowledge and technology to develop sustainable systems for aquaculture production of mapará and amazon shrimp with an ecosystem approach. Thus, initially this study had to make, the first attempts to domesticate and transport mapará breeders to a pond located in CAUNESP. Since this is an unprecedented proposal for bioprospecting, it was not possible to predict the response of mapará on the attempts of domestication, because even being intensively explored, there was not even a single information about its cultivation. The specie proved to be extremely sensitive to handling, which made us try to replace the breeders transport by attempts to induce spawning of wild breeders in their natural spawning location (being this, one of the objective of this thesis from the beginning). In this study we focus on two main objectives: the reproductive cycle of the species (manuscript I) and the standardization of a protocol for induced spawning (manuscript II). This study is than composed by two manuscripts, which the first generated information for the second. The lack of information and the problem with dams in the study region led us to approach others subjects, necessary but not predicted, such as the interruption of migratory routes, the dam impact on the population of mapará and about their reproductive biology. As a result, we found that the species presents reproductive peculiarities, because despite having a similar reproductive cycle of the total spawning fish when subjected to induced spawning processes, presents hormonal profile similar to parceled spawning fish. These characteristics made difficult to successfully establish spawning protocols. In conclusion, the species present a high sensitivity to the handling and

reproductive peculiarities, which make uncertain their domestication and breeding in captivity. This study presents some favorable results on the induced reproduction, but does not yet allow to define whether it can be included in potential species list to be used by the national aquaculture.

Key-words: mapará, reproductive cycle, crude extract of carp pituitary, gonadal steroids, gene expression.

INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional mundial dobrou nos últimos 50 anos, passando para mais de 6 bilhões de habitantes, assim como a média da demanda de pescados (per capita), durante esse mesmo período, que passou de 9kg para 17kg por ano (*Food and Agriculture Organization* (FAO), 2011). No Brasil, em 2010, a produção de pescados foi de 1.264.764,9 toneladas, sendo 62% proveniente da pesca extrativista, versus 38% da aquicultura (Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), 2011). Dados recentes revelam um incremento de 13% da produção total em 2011 (1.431.974,4t), sendo 56% da pesca extrativista e 44% da aquicultura (MPA, 2012). Em 2010 a aquicultura continental era composta por 63% de espécies exóticas (tilápias (*Oreochromis niloticus*), carpa (*Cyprinus carpio*) etc) versus 37% de espécies nativas (tambaquis (*Colossoma macropomum*), pacus (*Piaractus mesopotamicus*), pintados (*Pseudoplatystoma corruscans*), cacharas (*Pseudoplatystoma reticulatum*), híbridos etc). No entanto, em 2011 foi observado um crescimento a favor das espécies nativas, que passaram para 46% contra 54% das exóticas (MPA, 2012).

Mesmo com o crescimento da aquicultura, o extrativismo ainda gera impactos em algumas espécies endêmicas de certas regiões, geralmente sobre aquelas que possuem maior valor de mercado (MPA, 2011). Muitas destas espécies, mesmo sendo intensamente exploradas, nunca foram estudadas e nada se sabe sobre seu potencial para aquicultura (Costa, 2006).

A fauna de peixes de água doce da América do Sul é a mais diversa de todos os continentes, com um número estimado de mais de 4000 espécies (Reis, 2013). Apesar disso, a produção da aquicultura nacional em 2011 foi concentrada em 15 espécies nativas, com a seguinte composição: as produções de tambaqui (111.084t), híbridos de tambaqui e pacu (49.818t), pacu (21.689t) e outras (cascudo, curimatã, jundiá, matrinxã, piau, pirarucu, pirapitinga, piraputanga, pintado, tambatinga e traíra) (39.854t) corresponderam respectivamente a 45%, 25%, 10% e 20% do tal produzido. Já a produção da pesca extrativista, que engloba mais de 70 espécies com impacto significativo, passou de 239.492t em

2009 para 249.600t em 2011 (MPA, 2011). Portanto, nota-se que a demanda por pescados vem crescendo a cada ano, sobrecarregando tanto a pesca como a aquicultura, as quais se tornam cada vez mais intensivas e por sua vez sobrecarregam o meio ambiente (Almeida & Almeida, 2006).

O cultivo de espécies nativas pode apresentar vantagens, tais como: possui potencial para um maior valor de mercado (Ceccarelli *et al.*, 2000; Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007) e é uma das formas de diminuir o impacto sobre o meio ambiente e biodiversidade, pois eventuais fugas para natureza não causariam hipoteticamente tantos impactos como de espécies exóticas (Valenti, 2002; Simberloff *et al.*, 2013). Mesmo com as vantagens mencionadas, por falta de informações específicas sobre domesticação, cultivo e reprodução, as espécies exóticas como tilápias e carpas são as opções mais cultivadas (MPA, 2011). Estas espécies são consideradas as mais invasivas do mundo (Lowe *et al.*, 2000), competem pelos nichos, recursos e causam predação (Reis, 2013) e podem dizimar espécies nativas (Freire & Silva, 2008). Como exemplo, podemos citar a introdução proposital da carpa, como controle biológico nos Estados Unidos, que causou um desequilíbrio ecológico gravíssimo (Wittmann *et al.*, 2014).

Muitos países desenvolvidos têm gastado milhões de dólares para prevenir, controlar e erradicar espécies exóticas. No entanto, no Brasil, apesar do apoio governamental ter sido razoavelmente propiciado para o crescimento da aquicultura, pouco se investiu em responsabilidade ambiental, segurança ou sustentabilidade (Pelicice, 2013). O crescimento desordenado da aquicultura é o maior responsável, por exemplo, pela introdução de espécies exóticas como o salmão (*Salmo salar*) no Chile e tilápias, carpas e outras 13 espécies no Brasil (Reis, 2013).

Estudos de bioprospecção e estabelecimento de novas espécies nativas para a aquicultura são soluções rápidas para se contornar a primazia de espécies exóticas (Pelicice, 2013). O Brasil possui bacias e sub-bacias com diversas espécies de peixes. Para um crescimento sustentável pesquisas devem ser

conduzidas de forma regional, com estas espécies, para viabilizar a produção e ao mesmo tempo valorizar o pescado regional (Pelicice, 2013).

O processo de adaptação de espécies selvagens às condições de criação ocorre, em sua maioria, a médio e longo prazo, e é imprescindível a padronização de técnicas de manejo que atendam as necessidades de cada espécie (Agostinho *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2010). Pesquisas deste tipo são relevantes, pois os resultados podem gerar novas opções de espécies nativas para aquicultura promovendo um crescimento sustentável, além de ajudar preservar as espécies selvagens. Atualmente a aquicultura cresce rápida, mas de forma desorganizada e insustentável baseada em sistemas de monocultivo intensamente arraçados e com espécies exóticas (Valenti, 2008). A disponibilidade de espécies nativas com potencial para aquicultura pode diminuir o cultivo de espécies exóticas (Freire & Silva, 2008). Estes fatores trazem importantes reflexões e reforçam a necessidade de conhecermos e de utilizarmos as espécies nativas de forma mais intensa.

O manejo e conservação de recursos aquáticos são baseados em controle de pesca, estocagem e construção de escadas para a transposição de peixes. Infelizmente estas ações são comprometidas em grande parte por falta de informações científicas e estudos inadequados das populações de peixes e seus respectivos ciclos reprodutivos por região (Agostinho *et al.*, 2005).

As construções de escadas em barragens para permitir a passagem dos peixes apresentam elevada seletividade, além disso, a maioria dos peixes migradores são altamente dependentes da integridade das áreas que compõe as bacias (cabeceiras, canais principais e planícies de inundação associadas) (Agostinho *et al.*, 2005, Moretto, 2005, Arrais *et al.*, 2013), portanto como medidas iniciais o estudo detalhado do ciclo reprodutivo, bem como desenvolvimento de protocolos de reprodução de matrizes selvagens de espécies migradoras pode ser uma solução mais efetiva para diminuir o impacto sobre fauna nativa de peixes.

Espécie estudada

Entre as espécies nativas altamente exploradas pela pesca destacamos um grupo de bagres planctófagos conhecidos como “maparás”, *Hypophthalmus* spp, espécies que contabilizaram 9.622,9t para a pesca extrativista do país em 2011 (MPA, 2012). Estas espécies estão entre as principais espécies de importância pesqueira na região amazônica (Cintra *et al.*, 2007, Gonçalves & Baptista 2008), figurando entre as cinco espécies mais abundantes nos desembarques de pescado (Gonçalves & Baptista, 2008). Neste contexto, apesar de sua destacada importância na região amazônica, e de ser intensamente explorada nos mercados nacionais (principalmente no sudeste) (Cutrim & Baptista, 2005) e internacionais (Costa, 2006), não se encontram dados na literatura sobre seu ciclo reprodutivo, domesticação ou especialmente no que diz respeito à produção de alevinos. Neste contexto, apenas recentemente, em virtude da sua importância na pesca extrativista, esta espécie, junto com o aruanã, vem sendo apontada como uma das “novas” espécies com potencial para aquicultura (Costa, 2006).

O mapará utilizado neste estudo, (*Hypophthalmus marginatus*), (Figura 1) é um Siluriformes de porte médio, pertencente à família sul-americana Pimelodidae. O gênero *Hypophthalmus* apresenta 2 outras espécies (*H. edentatus* e *H. fimbriatus*) (Cutrim & Batista, 2005). É um peixe com distribuição ampla na América do Sul incluindo a bacia Amazônica (Carvalho & Merona, 1986) e a bacia do Rio Paraná (Nakatani *et al.*, 1998). De acordo com Cutrim & Baptista, (2005), esta espécie difere dos Siluriformes em geral, quanto ao hábito alimentar e localização na coluna d'água, pois enquanto a maioria é demersal e carnívoro, os maparás são estritamente pelágicos e planctófagos, características estas, que poderiam ser muito bem aproveitadas em sistemas de policultivo, por nadarem ativamente na coluna d'água e filtrarem o plâncton.



Figura 1. Mapará (*Hypophtalmus marginatus*), barra representa 5cm.

O *H. marginatus* possui elevado potencial zootécnico, apresentando um bom rendimento de carne (53%) com composição favorável (12,85% PB; 65,18% U; 21,21% EE) (Costa *et al.*, 2010), possui filé desprovido de espinhos intramusculares em forma de “Y” (mioceptos). No entanto, apesar da destacada importância pesqueira e de suas qualidades zootécnicas, a espécie não é aproveitada para a produção aquícola nacional e não existem informações sobre seu cultivo. Desta forma, o objetivo deste estudo foi conhecer a biologia reprodutiva da espécie no baixo Rio Tocantins, especialmente o ciclo reprodutivo das fêmeas e época de desova, para fomentar tentativas de reproduzir exemplares selvagens com protocolos de reprodução induzida.

Desenvolvimento ovocitário em teleósteos

De uma maneira geral, o ciclo reprodutivo dos peixes apresenta um padrão cíclico de eventos na maior parte das espécies estudadas. O início do desenvolvimento ovocitário (crescimento primário) se dá normalmente ainda no inverno, e é o período onde ocorre um grande acúmulo de substâncias e organelas celulares nos ovócitos, as quais serão responsáveis por parte da produção do vitelo (a reserva nutricional do ovo, responsável pela sobrevivência

do embrião) (Guraya, 1986; Nagahama & Yamashita, 2008). Após o crescimento primário, em resposta a estímulos ambientais, inicia-se a produção de vitelo (vitelogênese), caracterizada por uma intensa atividade metabólica nos ovócitos, nos quais a taxa de consumo de oxigênio e incorporação de aminoácidos é aumentada muitas vezes (Nagahama & Yamashita, 2008). Concluída a vitelogênese, os ovócitos entram em um “período de dormência”, se tornando aptos para os próximos passos da ovogênese, que são a maturação final e ovulação (ocorre na natureza com influência de estímulos ambientais) (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Todo processo de desenvolvimento ovocitário é controlado endogenamente por um sistema endócrino, principalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que sintetiza e libera gonadotropinas, esteróides gonadais e hormônios moduladores do processo reprodutivo (Weltzien *et al.*, 2004; Mylonas *et al.*, 2010). Neste processo o desenvolvimento das gônadas, maturação, liberação e fertilização dos gametas ocorrem em sincronia com fatores ambientais como variação de fotoperíodo, temperatura e chuvas (Tyler & Sumpster, 1996; Mylonas *et al.*, 2010). Sendo assim, todo o controle endócrino deve ser alterado de alguma forma, quando espécies migradoras são transferidas para o cativeiro, pois, neste ambiente confinado, os peixes reofílicos (peixes de piracema) não conseguem liberar seus gametas de forma natural (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007).

Desta forma, merece destaque o papel de substâncias conhecidas como esteróides gonadais. Dentro do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, os esteróides são produzidos nas gônadas (ovários e testículos) mediante estimulação por gonadotropinas (FSH e LH) produzidas e secretadas na hipófise. Nas gônadas, o estradiol é responsável por estimular a fase vitelogênica do ovo, nos meses que antecedem a reprodução, enquanto que substâncias derivadas da progesterona são responsáveis pelo processo de maturação final dos ovócitos e ovulação (Nagahama & Yamashita, 2008). Além disso, evidências obtidas em espécies de regiões temperadas (Brooks *et al.*, 1997), como o salmão e a truta, como também em peixes nativos (Hainfellner *et al.*, 2012a; De Souza *et al.*, 2015) indicam que

reprodutores de peixes que não recebem condições adequadas de manejo, como elevadas densidades de estocagem e baixos níveis de oxigênio, apresentam concomitantemente alterações nos níveis dos esteróides gonadais e desempenho reprodutivo desfavorável muitas vezes com a produção de ovos e larvas de má qualidade.

Manejo reprodutivo em peixes de interesse comercial

Pouco se sabe sobre o efeito do manejo sobre o desempenho reprodutivo de espécies migradoras nativas de importância comercial, no entanto, no pacu, foi demonstrado que baixos níveis de oxigênio durante o procedimento de reprodução induzida podem levar a baixas taxas de sobrevivência larval e queda no número de fêmeas que respondem aos tratamentos hormonais (Dabrowski *et al.*, 2003). Com reprodutores de curimatá, foi demonstrado que indivíduos mantidos em elevadas densidades em tanques-redes tiveram níveis plasmáticos de estradiol reduzidos e conseqüentemente a vitelogênese comprometida. Sabe-se que a redução na quantidade de vitelo, ligada a um manejo inadequado, está associada com a formação de ovócitos de baixa qualidade e período reprodutivo reduzido quando comparado com peixes mantidos em densidades ideais (Hainfellner *et al.*, 2012b). De acordo com estes autores (Dabrowsky *et al.*, 2003; Hainfellner *et al.*, 2012b), o desempenho reprodutivo inadequado está relacionado com redução nos níveis de esteróides gonadais dos reprodutores submetidos a hipóxia ou manejo inadequado. Ainda neste contexto, recentemente Honji (2007) demonstrou que tabaranas, *Salminus hilarii*, que vivem em regiões onde são impossibilitadas de realizar seus movimentos migratórios, pela presença de barramentos, apresentam menores concentrações de esteróides gonadais quando comparadas com peixes que vivem em rios onde não há interferência humana. Portanto, associado ao estabelecimento de protocolos de desova bem sucedidos, o manejo adequado de qualquer espécie é condição imperativa para domesticá-la e reproduzi-la com sucesso.

Ciclos reprodutivos em peixes migradores nativos

Os peixes migradores apresentam um padrão similar, lógico e sequencial ao longo do processo de desenvolvimento ovocitário e de maturação testicular, o qual reflete e determina os chamados “estádios de desenvolvimento ovariano e testicular”. Estudos desenvolvidos com espécies coletadas em ambiente natural descrevem, com algumas variações, cinco estádios de desenvolvimento, sendo eles: jovem (animais imaturos que muitas vezes não são encontrados nas coletas), repouso, maturação (normalmente subdividida em fases), maduro e esgotado (às vezes com a subdivisão: semi-esgotado) (Zaniboni-Filho & Resende 1988; Veregue & Orsi, 2003; Alvarenga *et al.*, 2006 e outros).

Neste contexto, a importância dos estudos de ciclos reprodutivos em ambiente natural é vasta, pois podem existir peculiaridades entre as espécies. Além disso, são comuns os relatos de peixes migradores de uma mesma região, que apresentam um mesmo padrão de desenvolvimento, porém alterações no ciclo reprodutivo entre os anos, dependendo de variações ambientais, podem ocorrer mudanças nas estratégias de sobrevivência (Roff, 1982). A preservação dos estoques naturais de uma espécie depende invariavelmente do conhecimento de seu ciclo reprodutivo em dois principais aspectos. Em uma primeira vertente este conhecimento é aplicado diretamente ao estabelecimento de épocas de defeso de peixes (baseado no conhecimento da idade de primeira maturação e nos locais de desova). Em outra vertente, o estudo do ciclo reprodutivo natural é fundamental para se aplicar com sucesso as técnicas de reprodução induzida.

Esta última vertente mencionada pode ser desdobrada em diversos aspectos. Um dos mais importantes é conhecer as características físico-químicas da água habitada por estes animais na natureza, bem como e principalmente as características da água nos locais de desova. Fatores como temperatura, condutividade e concentração de oxigênio dissolvido na água precisam ser os mesmos utilizados para o cultivo da espécie, para elevar as chances de adaptação em cativeiro, principalmente no momento específico da produção de alevinos (Woyнарovich & Horváth, 1989). No caso da desova dos peixes, por

exemplo, duas etapas merecem destaque: as características da água onde os reprodutores são mantidos (durante a indução hormonal) e das incubadoras onde as larvas se desenvolverão. Água com características físico-químicas não adequadas pode prejudicar a produção de alevinos em diversos aspectos (Woynarovich & Horváth, 1989). Os reflexos do uso de água inadequada vão desde fêmeas que não respondem aos tratamentos hormonais até baixas taxas de sobrevivência de ovos e larvas.

Portanto, o conhecimento do ciclo reprodutivo é importante para se desenvolver um manejo reprodutivo em cativeiro, considerando a época do início das migrações (vitelogênese) e do processo de desova. O conhecimento da época de desova na natureza, as correlações entre as classes de desenvolvimento ovariano, níveis de gonadotrofinas (e de seus respectivos genes) e de esteróides gonadais em ambiente natural constituem informações básicas para o desenvolvimento de um manejo reprodutivo (Honji *et al.*, 2009).

REFERÊNCIAS

Agostinho ÂA, Thomaz SM, Gomes LC. 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, 1, 70-78.

Almeida O & Almeida B. 2006. Caracterização e análise financeira da indústria pesqueira, p. 83-107. In: Almeida, O (Org.). *A indústria pesqueira na Amazônia*. Coleção Estudos Estratégicos. IBAMA/Provarzea. 110.

Alvarenga ER, Bazzoli N, Santos GB, Rizzo E. 2006. Reproductive biology and feeding of *Curimatella lepidura* (Eigenmann & Eigenmann) (Pisces, Curimatidae) in Juramento reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Braz. Zool.* 23:2, 314-322.

Arrais AA, da Costa AB, Köhler A. 2013. Implantação de sistema de transposição para peixes junto a hidrelétricas: aspectos técnicos a serem considerados para as pequenas centrais hidrelétricas. *Caderno de Pesquisa*, 24:2, 71-93.

Carvalho JL & Merona B. 1986. Estudos sobre dois peixes migratórios do baixo Tocantins, antes do fechamento da barragem do Tucuruí. *Amazoniana*, 4: 595-607.

Ceccarelli OS, Senhorini JA, Volpato G. 2000. *Dicas em piscicultura-perguntas e respostas*. Ed. Santana, Botucatu. 247p.

Cintra IHA, Juras AA, Andrade JAC, Ogawa M. 2007. Caracterização dos desembarques pesqueiros na área de influência da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Estado do Pará, Brasil. *Boletim Técnico-Científico do CEPNOR*, 7: 135-152.

Costa TV, Oshiro LMY, Silva ECS. 2010. O potencial do mapará *Hypophthalmus spp.* (Osteichthyes, Siluriformes) como uma espécie alternativa para a piscicultura na Amazônia. *Boletim do Instituto de Pesca*, 36: 165–174.

Costa TV. 2006. Identificação de novas espécies com potencial para a criação em cativeiro: pescado capturado no estado do Amazonas. *Seropédica/RJ*, 65p. (Dissertação de Mestrado. PPG Zootecnia, Universidade Federal Rural do

Rio de Janeiro - UFRRJ). Disponível em:
<http://bdtd.ufrrj.br//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=373>.

Cutrim L & Batista VS. 2005. Determinação de idade e crescimento do mapará (*Hypophthalmus marginatus*) na Amazônia Central. Acta Amazônica, 35: 85 – 92.

Dabrowski K, Lee K, Rinchar J. 2003. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. Journal Nutrition, 133: 4225-4229.

De Souza TG, Hainfellner P, Kuradomi, RY, Moreira RG, Batlouni SR. 2015. Inappropriate management conditions, especially during the regressed class, affect the quality of the semen and DNA of sperm in *P. lineatus*. Theriogenology, 83: 797-807.

Food and agriculture organization. UN. 2011. FAOSTAT. <<http://faostat.fao.org/>>.

Freire JL & da Silva BB. 2008. Aspectos sócio-ambientais das pescarias de camarões dulciolas (*Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 e *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879)(DECAPODA, PALAEMONIDAE) na região Bragantina-Pará-Brasil. Boletim do Laboratório de Hidrobiologia, 21:51-62.

Gonçalves C & Baptista VS. 2008. Avaliação do desembarque pesqueiro efetuado em Manacapuru, Amazonas, Brasil. Acta Amazônica, 38: 135-144.

Guraya SS. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. H.W. Sauer, editor. Monographs in Developmental Biology. New York.18: 1- 233.

Hainfellner P, Munõz ME, de Souza TG, Freitas GA, Batlouni SR. 2012a. Spawning failure in *Brycon amazonicus* may be associated with ovulation and not with final oocyte maturation. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 64: 515- 517.

Hainfellner P, de Souza T, Moreira RG, Nakaghi LSO, Batlouni SR. 2012b. Low estradiol levels, delayed vitellogenesis and reduced amounts of yolk are dysfunctions associated with the formation of low quality oocytes in

Prochilodus lineatus (Teleostei: Characiformes). Neotropical Ichthyology, 10: 601-612.

Honji RM, Narcizo AM, Borella MI, Romagosa E, Moreira RG. 2009. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). Fish Physiology and Biochemistry, 35:109–123.

Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database Species Survival Commission, World Conservation Union (IUCN), Auckland, New Zealand: Invasive Species Specialist Group. Moretto, 12.

Ministério da pesca e aquicultura – MPA 2011, 2012. dados. <<http://www.mpa.gov.br/MPA>, 2012>.

Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165: 516-534.

Nagahama Y & Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish. 2008. Development Growth and Differentiation, 50: 195–219.

Nakatani K, Baumgartner G, Latini JD. 1998. Morphological description of larvae of the mapará *Hypophthalmus edentatus* (Spix) (Osteichthyes, Hypophthalmidae) in the itaipu reservoir (Paraná River, Brazil). Revista Brasileira Zoologia. 15 (3): 687-696.

Pelicice FM, Vitule JRS, Lima Junior DP, Orsi ML, Agostinho AA. 2014. A serious new threat to Brazilian freshwater ecosystems: the naturalization of nonnative fish by decree. Conservation Letters, 7:1, 55-60.

Reis RE. 2013. Conserving the freshwater fishes of South America. International Zoo Yearbook, 47:1, 65-70.

Roff DA. 1982. Reproductive strategies in flatfish: a first synthesis. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 39: 1686-1698.

Simberloff D, Martin JL, Genovesi P. 2013. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends Ecol. Evol.*, 28, 58-66.

Tyler CR & Sumpter JP. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 287–318.

Valenti WC. 2002. Aquicultura sustentável. In: Congresso de Zootecnia, 12o, 2002. Vila Real, Portugal. Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais... p.111-118.

Valenti WC. 2008. A aquicultura brasileira é sustentável? *Aquicultura & Pesca*, 34:36-44

Veregue AML & Orsi ML. 2003. Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes: Characidae) do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia* 20:97-105.

Weltzien FA, Andersson E, Andersen A, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B. 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 137: 447-277.

Wittmann ME, Jerde CL, Howeth JG, Maher SP, Deines AM, Jenkins JA, ... Lodge DM. 2014. Grass carp in the Great Lakes region: establishment potential, expert perceptions, and re-evaluation of experimental evidence of ecological impact. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 71:7, 992-999.

Woynarovich E & Horváth L. 1989. Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 225p

Zaniboni-Filho E & Resende EK. 1988. Anatomia de gônadas, escala de maturidade e tipo de desova do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). *Ver. Brasil. Biol.*, 48: 833-844.

Zaniboni-Filho E & Weingartner M. 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31: 367-373.

MANUSCRITO I

Ciclo reprodutivo de fêmeas de mapará (*Hypophthalmus marginatus*) no baixo Rio Tocantins, à jusante da barragem de Tucuruí

RESUMO

O objetivo deste estudo foi descrever o ciclo reprodutivo de fêmeas de mapará (*Hypophthalmus marginatus*) em ambiente natural. Para isso, entre 15 de dezembro de 2011 e 30 de dezembro de 2013, aproximadamente a cada dois meses foram feitas amostragens de maparás adultos coletados no Rio Tocantins, à jusante da Usina Hidrelétrica de Tucuruí (S 3°49'55" W 49°39'9"). No total, 294 indivíduos foram amostrados, submetidos às análises biométricas e, após anestesia (benzocaína (0,1g/L), tiveram amostras de órgãos e sangue coletados. Foram calculados os índices gônado, viscero e hepatossomático. Amostras dos ovários foram submetidas ao processamento histológico e amostras de sangue foram utilizadas para determinação das concentrações de esteróides gonadais (17 β -estradiol (E₂), 11-Cetotestosterona, 17 α -hidroxiprogesterona e 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (MIS). Com as hipófises coletadas foram determinados os valores de expressão gênica da subunidade beta do hormônio foliculo estimulante (*fshb*) e subunidade beta do hormônio luteinizante (*lhb*). O ciclo reprodutivo foi determinado com base em todas as análises e variáveis anteriormente mencionadas. A espécie apresenta longo período de repouso (fevereiro à setembro), vitelogênese curta (outubro e novembro) e em dezembro a maioria das fêmeas se apresenta madura, mas não desovadas. Os níveis de expressão genica de *fshb* e *lhb* e as concentrações plasmáticas de E₂ e MIS se mantiveram constantes a maior parte do ano, mas a partir do mês de agosto apresentaram picos que se associaram com vitelogênese e período reprodutivo. A espécie apresenta ciclo reprodutivo similar à peixes de desova total, mas mais estudos são necessários para definir as estratégias reprodutivas da espécie, pois este aspecto se associa diretamente à estratégia utilizada para promover sua reprodução induzida.

Palavras-chave: mapará, ciclo reprodutivo, desenvolvimento ovocitário, esteróides gonadais, expressão gênica.

ABSTRACT

The objective of this study was to describe the reproductive cycle of mapará's females (*Hypophthalmus marginatus*) in natural environment. To this end, between December 15, 2011 until December 30, 2013, approximately every two months sampling of adults maparás were collected on the Tocantins River, downstream of the Tucuruí Hydroelectric Plant (S 3°49'55 "W 49°39'9"). In the total, 294 individuals were subjected to biometric analysis and after anesthesia (benzocaine (0.1 g/L) had samples from their organs and blood collected. The indices gonado, viscera and hepatossomatic were calculated. Samples of the ovaries were subjected to histological processing and blood samples were taken for determination of the concentrations of gonadal steroids (17 β -estradiol (E2), 11-Cetotestosterona, 17 α -hydroxyprogesterone, and 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (MIS). With the collected pituitaries were determined the gene expression values of the beta subunit of follicle stimulating hormone (*fshb*) and beta subunit of luteinizing hormone (*lhb*). The reproductive cycle was determined based on all analyzes and the aforementioned variables. The specie has long resting period (February to September), short vitellogenesis (October and November) and in December most females are mature, but not spawned. The gene expression levels of *fshb* and *lhb* and plasma concentrations of E2 and MIS remained constant most of the year, but at the beginning of August there are some peaks that were associated with vitellogenesis and reproductive period. The species present reproductive cycle similar to that of total spawning fish, but more studies are needed to define the reproductive strategies of the species, as this aspect is directly associated with the strategy used to promote its induced reproduction.

Keywords: mapará, reproductive cycle, oocyte development, gonadal steroids, gene expression.

INTRODUÇÃO

O mapará (*Hypophthalmus marginatus*) é um Siluriforme de porte médio, pertencente à família sul-americana Pimelodidae (Cutrim & Batista, 2005). É um peixe com distribuição ampla na América do Sul incluindo a bacia Amazônica (Carvalho & Merona, 1986) e a bacia do Rio Paraná (Nakatani *et al.*, 1998). De acordo com Cutrim & Baptista, (2005), esta espécie difere da maioria dos outros bagres quanto ao hábito alimentar e localização na coluna d'água, pois enquanto a maioria é demersal e carnívoro, os maparás são estritamente pelágicos e planctófagos.

Em 2011, no Brasil foi contabilizado 9.622,9t de maparás (*Hypophthalmus* spp) provenientes da pesca extrativista (MPA, 2012), figurando, portanto, entre as principais espécies de importância pesqueira na região amazônica (Cintra *et al.*, 2007 e Gonçalves & Baptista 2008). Os maparás estão entre as cinco espécies mais abundantes nos desembarques de pescado (Gonçalves & Baptista, 2008), e além de serem intensamente explorado nos mercados nacionais (principalmente no sudeste) (Cutrim & Baptista, 2005) e internacionais (Costa, 2006), têm um papel fundamental para integridade biótica, por serem espécies de baixo nível trófico. Estas espécies são base de alimento para diversas outras espécies aquáticas e terrestres, e a redução de seus estoques naturais pode acarretar uma cadeia de eventos com prejuízos incalculáveis para fauna (Lyons *et al.*, 1995).

No Brasil, com o desenvolvimento e crescimento populacional, a demanda por energia elétrica vem sendo subsidiada quase que exclusivamente por hidroelétricas (Tolmasquim, 2012). Foram construídas mais de 600 barragens que causam: alterações na época e duração da formação das áreas inundadas (berçários naturais de peixes); modificações no percurso e fluxo natural dos rios; alterações na qualidade e disponibilidade de nutrientes na água. Possivelmente, estes são os principais fatores responsáveis pela diminuição dos estoques naturais de espécies de peixes migradores (Agostinho *et al.*, 2005).

Estudos realizados na hidroelétrica de Tucuruí mostram que após 20 anos da sua construção, o Baixo Rio Tocantins antes marcado pelas corredeiras e áreas rochosas hoje possui duas regiões distintas: montante, caracterizada por ambiente lacustre, favorece o desenvolvimento de espécies lênticas (ex: mapará (*Hypophtalmus marginatus*), tucunaré (*Cichla* spp.), pescada branca (*Plagioscion squamosissimus*)) (Mérona *et al.*, 2010); e jusante, caracterizada por áreas rochosas cortadas pelas águas que formam corredeiras, as quais favorecem o desenvolvimento de espécies lólicas. A maioria das espécies que ocorrem à jusante da barragem são migradoras e não completam o ciclo reprodutivo por causa da barragem (Mérona *et al.*, 2010; Alho *et al.*, 2015). Foi constatado que os problemas mais graves atingem a jusante, pois ocorrem mudanças diárias e semanais no volume do rio de acordo com a demanda por eletricidade, todos os dias a tarde há uma elevação no volume e nos finais de semana há um grande decréscimo causado pela baixa demanda de energia pelas indústrias (Alho *et al.*, 2015). A barragem e as variações no volume de água erradicaram ou diminuíram significativamente populações de espécies de peixes reofilícos, pois impedem a rota de migração, rompem os ciclos naturais da alimentação, mas principalmente, as variações semanais no volume de água são suficientes para expor e matar alevinos e ovos de peixes protegidos nas vegetações ou áreas inundadas (Mérona *et al.*, 2010; Alho *et al.*, 2015).

A chave para o gerenciamento eficaz da exploração de peixes e conservação de seus estoques naturais é o entendimento das suas estratégias reprodutivas em ambiente natural (Silva *et al.*, 2014), o objetivo deste estudo foi descrever a biologia reprodutiva das fêmeas de mapará, que ocorre no baixo Rio Tocantins, à jusante da hidroelétrica de Tucuruí. As informações obtidas serão utilizadas para determinar a época de desova e, dessa forma, fomentar estudos para reproduzir artificialmente os maparás contidos nas barragens.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta

Este estudo foi desenvolvido na região do Baixo Tocantins, à jusante da barragem de Tucuruí (S 3°49'55" W 49°39'9"), a qual se localiza às margens do município de Tucuruí (a cerca de 300 km ao sul de Belém), PA (Figura 1). O local foi escolhido por apresentar uma crescente diminuição nos estoques de maparás durante os últimos 20 anos. Foram feitas prospecções em outros pontos à jusante da barragem, mas a distância e escassez de peixes impediu a utilização dos mesmos.

Coletas

Quatorze coletas foram realizadas sempre durante à noite e madrugada, entre as 20:00 e as 06:00, nos seguintes períodos: 15 a 17/12/2011 (coleta de "Dez/2011"), 22 a 28/3/2012 (coleta de "Mar/2012"), 14 a 24/5/2012 (coleta de "Mai/2012"), 13 a 20/8/2012 (coleta de "Ago/2012"), 25/9/2012 (coleta de "Set/2012"), 19/10/2012 (coleta de "Out/2012"), 6 a 15/11/2012 (coleta de "Nov/2012"), 7 a 18/12/2012 (coleta de "Dez/2012"), 20 a 27/01/2013 (coleta de "Jan/2013") e 15 a 21/4/2013 (coleta de "Abr/2013"), 28/06/2013 a 07/07/2013 (coleta de "Jun/2013"), 16 a 25/08/2013 (coleta de "Ago/2013"), 18 a 31/10/2013 (coleta de "Out/2013), 29/11/2013 a 29/12/2013 (coleta de "Dez/2013"). Todas as coletas foram feitas com prévia autorização concedida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através de autorização renovada anualmente pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (números: 27884-2; 27884-3; 27884-4; 27884-5).

Os peixes foram coletados com redes de espera (malhadeiras sem nós, malha 50mm, comprimento de 100m por 5m de altura) por pescadores profissionais da região. Pelo fato dos maparás necessitarem de natação constante, as redes foram constantemente verificadas e retiradas imediatamente da água quando eram observados movimentos bruscos das boias, os quais indicavam a presença de peixes. Os peixes capturados e ainda vivos (os mortos foram descartados) foram transportados em caixas de 80L preenchidas com água do rio com adição de 0,3% de NaCl. Em terra, os peixes foram realocados em caixas d'água circulares de 500L, onde os procedimentos de coleta foram imediatamente iniciados.

Biometria, dissecação e procedimentos gerais

Após a anestesia (benzocaína (0,1g/L), os peixes foram submetidos a uma análise biométrica onde foram registrados: a massa total (Mt) por meio de um dinamômetro (com acurácia de 0,01g) e o comprimento total (Ct) por meio do uso de um ictiômetro (com acurácia de 0,1mm).

Após a biometria, amostras de sangue (± 3 mL) foram imediatamente colhidas por punção de vasos caudais, utilizando seringas e agulhas descartáveis previamente lavadas com anticoagulante (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético(EDTA)). O sangue coletado foi transferido para micro tubos (3mL) e então centrifugado a 3000G por 10min, sendo o plasma aliquoteado em criotubos, os quais eram congelados e mantidos em nitrogênio líquido à -196°C até o momento de seu uso.

Para coleta das hipófises, os instrumentos cirúrgicos foram pulverizados com spray Anti-RNase e luvas sem talco. Após a remoção da hipófise, esta foi imediatamente submergida e mantida em solução estabilizadora de RNA(Ácido Ribonucleico) (RNAlater® solution - Ambion® Inc., Applied Biosystems™, USA) por 24h a 4°C . Após este período, a solução contendo a hipófise foi estocada em nitrogênio líquido à -196°C até o momento de seu uso.

Após a coleta do sangue e hipófise, foi realizada uma incisão ventral a partir do orifício urogenital até a região da boca para a retirada dos ovários, fígado e vísceras, os quais foram pesados com dinamometro (acurácia de 0,01g). Com esses dados, foram calculados os seguintes índices corpóreos:

- Índice hepatossomático (IHS) $=[(\text{massa do fígado (g)} / \text{massa total (g)}) \times 100]$;
- Índice gonadossomático (IGS) $=[(\text{massa dos ovários (g)} / \text{massa total (g)}) \times 100]$;
- Índice viscerossomático (IVS) $=[(\text{massa das vísceras (g)} / \text{massa total (g)}) \times 100]$;

Toda metodologia adotada durante o desenvolvimento do presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp (Jaboticabal, SP, BR).

Análises histológicas e morfométricas dos ovários

Amostras das regiões cranial, média e caudal dos ovários foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, por 24h. Em seguida, foram lavadas em solução tampão fosfato (0,1M, pH 7,2) e submetidas ao processo de inclusão em historesina (Leica) para obtenção de cortes histológicos (com espessura de 2 μ m), os quais foram corados com Hematoxilina-Eosina.

Para determinar a frequência de volume ocupada pelos distintos tipos de ovócitos (pré-vitelogênicos, alvéolo-corticais, vitelogênicos, folículos pós-ovulatórios e atrésicos), durante as coletas, foi utilizado um microscópio Olympus BX41 com sistema de captura Olympus DP11 capture (objetiva de 4x e ocular de 10x = 40x). Para cada peixe, foram utilizados 4 campos microscópicos aleatórios, para cada região dos ovários (cranial, média e caudal), ou seja, 12 campos microscópicos por ovário. As contagens foram feitas em um grid com 300 pontos (20x15), foram computados os pontos sobre as distintas estruturas mencionadas no parágrafo anterior e calculadas suas frequências (n° pontos * 100/total de pontos). O método utilizado para contagem foi o mesmo usado por Alvarenga & França (2009) com algumas modificações.

Para caracterização das classes de maturação ovariana foram desenvolvidos critérios com base nos resultados obtidos com as análises morfométricas. Ovários que apresentavam predominantemente ovócitos pré-vitelogênicos (>90%) foram considerados como em “repouso/imaturos”; ovários preenchidos com ovócitos alvéolos corticais e vitelogênicos foram considerados como em “início de maturação”; ovários preenchidos com ovócitos vitelogênicos (>10%) foram considerados “maduros”; ovários com presença de folículos pós-ovulatórios e por ovócitos vitelogênicos foram considerados como “desovados”; ovários que apresentaram ovócitos atrésicos (>10%) foram definidos como “atrésicos”. Após a determinação dos estádios, foram determinados os percentuais médios de cada tipo ovocitário em cada estágio de maturação ovariana.

Análise dos esteroides gonadais

Todo processo de análise de esteroides gonadais foi realizado sob supervisão da Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP.

As análises dos hormônios esteroides foram realizadas de Mar/2012 a Dez/2013. Foi dosado: 17β -estradiol (E_2), 11-Cetotestosterona (11-KT), 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP) e 17α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (MIS) utilizando kits comerciais (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA) de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), seguindo as instruções do fabricante. Para isso, o plasma armazenado em nitrogênio líquido à -196°C foi descongelado em temperatura de 5°C . Todas as amostras foram processadas em duplicatas e as validações dos kits foram determinadas calculando os coeficientes de variação (% CV) intra e inter-ensaios e pico de recuperação (%). O limite aceitável para o CV inter-ensaio foi $\leq 20,0\%$ e para o pico de recuperação, de 90 – 110 % (Sink et al., 2008). As medições de absorbância foram realizadas utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, CA, EUA).

Extração de RNA e síntese de cDNA

Todo o processo de extração de RNA e síntese de cDNA foi realizado no Laboratório de Biotecnologia (Laboratório de Reprodução de Peixes, do Centro de Aquicultura da UNESP – Campus de Jaboticabal).

Nesta etapa, as hipófises foram descongeladas e transferidas para microtubos contendo 500µL de Trizol, onde foram maceradas com ajuda de agulhas descartáveis (1,60x40mm). Logo em seguida, mais 500µL de Trizol foram adicionados à mistura, a qual permaneceu por 5min em temperatura ambiente. Após esta etapa, foram adicionados 200µL de clorofórmio, a mistura foi homogeneizada vigorosamente e mantida por 3min à temperatura ambiente. Para separação da fase aquosa, que contém o RNA, as amostras foram então centrifugadas a 12000G por 15min em centrífuga refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, foi retirado a fase aquosa (superior) que foi armazenada em um microtubo limpo (RNase free) com a adição de 500µL de isopropanol. O microtubo foi agitado por inversão, incubado por 10min em temperatura ambiente e centrifugado novamente a 12000G por 10min a 4°C. Após esta etapa, os tubos foram esvaziados (tomando o cuidado para que o pellet formado não se desprendesse), adicionou-se 1000µL de etanol 75% e homogenizou-se a solução até soltar o pellet. O material foi centrifugado novamente a 7500G por 5min a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o tubo com o pellet foi deixado aberto para secagem. O RNA obtido foi eluído em água MiliQ (RNase free) e quantificado espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Uniscience).

O DNA complementar (cDNA) foi obtido pelo método de transcrição reversa a partir de 2µg de RNA total que foi usado como fita molde utilizando o kit *Superscript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Todos os procedimentos a seguir foram realizados sob supervisão do Prof. Wei Ge, na *Faculty of Health Sciences* na Universidade de Macau – China.

O cDNA obtido de cada amostra foi diluído para a concentração de 6ng/μL e analisado pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em placa optica de 96 poços (em duplicata) em um termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad), com auxílio de um analisador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System. Para a confecção dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes da fração beta do hormônio foliculo estimulante (*fshb*), da fração beta do hormônio luteinizante (*lhb*) e do fator de alongação1-alpha (*ef1a*) (gene normalizador) foram utilizadas sequencias de outras espécies de peixes encontradas no *The National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para tentar encontrar regiões conservadas para sequencias de interesse, utilizamos a ferramenta *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Para isso, foram utilizadas sequências já conhecidas de pelo menos 3 espécies de peixes para cada gene (Tabela I). Encontradas as regiões conservadas, foram selecionados senso e anti-senso com aproximadamente 20 pares de bases e mantida a distância de 150-250 pares de bases entre eles (para manter um padrão de semelhança)(tabela I). Os *primers* foram desenhados, a partir das regiões selecionadas, com auxílio da ferramenta *PCR Primer Stats* (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html). Os resultados obtidos foram enviados para *Integrated DNA Technologies (IDT)* para confecção dos primers.

Para cada reação de RT-qPCR foram utilizados 15μL, constituídos de: 0,15μL com 200 nM de oligonucleotídeos de iniciação senso; 0,15μL com 200 nM de oligonucleotídeos de iniciação anti-senso; 5μL de amostra (concentração 6ng/μL); 7,5μL de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories); 2,2μL de UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen™).

As expressões dos genes *fshb* e *lhb* foram normalizadas pelo gene de referencia o *ef1a* e os cálculos de eficiência e expressão foram conduzidos seguindo a metodologia descrita por Bogerd *et al.* (2001).

Características físicas e químicas da água nos locais de coleta

A água do local de coleta dos peixes foi analisada a cada coleta bimestral. As coletas de água sempre foram realizadas às 9h, em profundidade de 1,5 m. Foi utilizando um oxímetro HI 9146 – 10 (Hanna Instruments – Resolução: 0,01mg/L) para mensuração do oxigênio dissolvido; um medidor de pH HI 98172 (Hanna Instrument - Acurácia: $\pm 0,1$) para mensuração do pH; e um condutímetro HI 98311 (Hanna Instruments – para condutividade acurácia de 0,1 μ S/cm e para temperatura acurácia de 0,15°C,) para mensuração da condutividade e temperatura. A transparência da água nos locais de coleta foi determinada com uso de disco de Secchi.

Análises estatísticas

Os resultados de cada variável analisada foram comparados ao longo das coletas. Foi verificada a homocedasticidade e normalidade das variâncias, não sendo necessária a transformação dos dados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way), aplicou-se o teste F e este sendo significativo ($p < 0,05$), foi realizado o teste de Tukey a fim de diferenciar as médias à de 5% probabilidade. As análises dos dados foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS 8.2.

RESULTADOS

Foram coletadas e analisadas 156 fêmeas de mapará, ao longo de 14 coletas. A proporção sexual (macho: fêmea) foi 1:1,19. A Mt e o Ct mínimos e máximos foram registrados, respectivamente, em um macho de 200g e 37cm e em uma fêmea de 960g e 52cm. A Mt e Ct médios das fêmeas foram superiores aos dos machos em todas as coletas (Tabelas II).

Avaliando cada ano em separado, os valores médios de IGS dos meses de Dez/2011 e Dez/2012 foram, respectivamente, aproximadamente 5x, 3,5x superiores aos valores médios da maioria dos outros meses. O pico de IGS nos meses de dezembro de 2011 e 2012 indicou ser este o auge do período reprodutivo da espécie. As grandes elevações de IGS observadas em Dez/2011 e Dez/2012 foram seguidas de uma respectiva redução em Mar/2013 e Abr/2013. De Mar-Nov/2012 os valores de IGS foram predominantemente inferiores aos valores de Dez/2011-2012, caracterizando um longo período de repouso, exceto pelo ano de 2013, período em que não se observou um pico de IGS no mês de dezembro. Os valores de IGS mantiveram-se estáveis nos meses em que não se observou um pico de IGS (Figura 2A).

O perfil da distribuição dos valores de IVS apresentou picos em Dez/2011 e Abr/2013, e mantiveram-se estáveis durante o restante do ano, com valores médios de 1,5 (Figura 2B). O perfil da distribuição dos valores de IHS apresentou um pico em Dez/2011 e uma elevação em Ago/2012, e mantiveram-se estáveis nos outros meses analisados (Figura 2C). A avaliação histológica dos ovários possibilitou a classificação dos ovócitos em 6 subtipos. Os pré-vitelogênicos apresentaram diâmetro médio de $167,46 \pm 13,74 \mu\text{m}$. Nestas células o núcleo estava centralmente posicionado e apresentava numerosos nucléolos. O citoplasma era intensamente basofílico, e quanto menor diâmetro celular maior era intensidade da coloração nestas células (Figura 3A). Os ovócitos alvéolos-corticais apresentaram diâmetro médio de $378,73 \pm 10,52 \mu\text{m}$. Nestas células o núcleo era volumoso, centralmente posicionado, levemente corado e apresentava numerosos nucléolos. Na periferia do ooplasma encontravam-se numerosos

alvéolos corticais. (Figura 3B). Os ovócitos vitelogênicos apresentavam diâmetro médio de $628,04 \pm 33,02 \mu\text{m}$. Nestas células o núcleo era central ou levemente deslocado os grânulos de vitelo protéico coravam-se intensamente pela floxina e a célula atingia o diâmetro máximo (Figura 3D). Os folículos pós-ovulatórios não tiveram seus diâmetros calculados por não serem estruturas esféricas. (Figura 3E). Ovócitos atrésicos foram encontrados em distintas fases de desenvolvimento, mas predominantemente nas fases vitelogênicas (Figura 3F).

Com relação às classes de maturação gonadal, ovários em repouso/imaturos foram encontrados em todo período experimental. Só foram encontrados ovários desovados em Dez/2011. Ovários em maturação foram encontrados apenas em Nov/2012, Out/2013 e Dez/2013. Ovários maduros foram encontrados de novembro a abril, com pico de ocorrência mais pronunciada em dezembro. Comparando com o mês de Dez/2012, em Jan/2013 observamos uma redução do percentual de ovários maduros, um aumento no percentual de ovários em repouso/imaturos e o surgimento de ovários atrésicos, aspectos que caracterizam o período entre dezembro e janeiro como auge do período de desova. Em Abr/2013 mais de 50,0% dos ovários analisados estavam em repouso/imaturos e cerca de 30,0% ainda se apresentavam maduros. Ovários em maturação surgem novamente apenas em Out/2013, caracterizando um longo período de repouso e uma rápida vitelogênese, pois em Dez/2013 a maioria dos ovários analisados estavam maduros (Figura 4).

Os ovários em “repouso/imaturo” apresentaram quase 100% de ovócitos pré-vitelogênicos, com a ocorrência ocasional de raros ovócitos alvéolos corticais e atrésicos. Na classe de maturação observamos uma baixa frequência de ovócitos alvéolos corticais, vitelogênicos e atrésicos, com predomínio de pré-vitelogênicos. Nos ovários maduros observamos cerca de 60,0% de ovócitos pré-vitelogênicos, 20,0% de vitelogênicos e 5,0% de ovócitos alvéolos corticais. Os ovários desovados apresentam perfil similar aos ovários maduros, exceto por uma frequência relativamente baixa, mas presente, de folículos pós-ovulatórios. Os ovários atrésicos apresentaram perfil similar aos maduros, exceto pelo surgimento

de ovócitos atrésicos. Em todas as classes predominaram os ovócitos previtelogênicos (Figura 5).

As variações bimestrais nas concentrações plasmáticas dos esteroides gonadais estão apresentadas nas Figuras 6 e 7. A concentração plasmática de E_2 foi aproximadamente 50pg/mL entre Mar/2012 e Nov/2012, apresentando elevação brusca entre Nov/2012 e Dez/2012 (aproximadamente 550pg/mL). (Figura 6). Os valores reduziram drasticamente em Jan/2013 (aproximadamente 100pg/mL) e mantiveram-se estáveis até Dez/2013 (Figura 6). O pico de E_2 e IGS ocorrem simultaneamente em Dez/2012, bem como a ausência de pico para estas duas variáveis no mês de Dez/2013 (Figuras 1 e 6).

A distribuição dos valores médios da concentração plasmática de 11-KT apresentou pico em Mar/2012, redução entre Mar/2012 e Mai/2012. Após este período, os valores mantiveram-se estáveis até Nov/2012, e apresentaram uma elevação moderada entre Nov/2012 e Dez/2012. Posteriormente, em 2013, os valores de 11KT mantiveram-se estáveis, exceto por uma redução entre os meses de Abr/ 2013 e Jun/2013 (Figura 6).

A concentração plasmática de 17α -OHP apresentou pico em Mar/2012 (aproximadamente 0,075mg/mL) com redução brusca dos valores em Mai/2012 (aproximadamente 0,001mg/mL). Os valores de Mai/2012 mantiveram-se similares até Nov/2012, seguidos de uma elevação entre Nov/2012 e Abr/2013 (0,08ng/mL). No ano de 2013 os valores mantiveram-se estáveis (Figura 7).

A concentração plasmática da MIS foi aproximadamente 60ng/mL em Mar/2012, reduzindo para aproximadamente 20ng/mL em Mai/2012 e mantendo-se estável até Ago/2012. Os valores apresentaram elevação acentuada entre Ago/2012 e Nov/2012 (aproximadamente 120ng/mL), mas reduziram gradativamente entre Nov/2012 e Abr/2013 (aproximadamente 20mg). Entre Abr/2013 e Dez/2013 os valores mantiveram-se estáveis (Figura7).

A expressão genica do *lhb* apresentou dois picos, um em Jan/2013 e outro em Dez/2013 (aproximadamente 0,8) (Figura 8). Entre Abr/2013 e Out/2013 os valores mantiveram-se similares (entre 0,1 e 0,4).

Os valores médios da expressão gênica de *fshb* reduziram de aproximadamente de 0,55 em Jan/2013 para 0,25 em Jun/2013. Entre Jun/2013 e Ago/2013 os valores elevaram-se e atingiram aproximadamente 0,75, mantendo-se estáveis até Dez/2013 (Figura 8).

As médias anuais (\pm EP) de pH $6,8\pm 0,1$, temperatura $29,9^{\circ}\text{C}\pm 0,4^{\circ}\text{C}$, oxigênio dissolvido $5,7\text{mg/L}\pm 0,2\text{mg/L}$, condutividade $42,9\mu\text{s}\pm 1,8\mu\text{s}$ e transparência $1,5\text{m}\pm 0,1\text{m}$ estão apresentadas na Tabela III.

DISCUSSÃO

Ao longo de 14 coletas realizadas, observamos uma proporção de fêmeas ligeiramente superior à de machos (1,0M:1,19F), assim como o observado por Cintra *et al.*, 2008 (1,0M:2,0F). Mesmo assim, em coletas em ambiente natural, este aspecto precisa ser observado com cautela, pois se sabe que as populações de bagres em geral distribuem-se em diversos cardumes, que vivem em diversas profundidades, com diferentes composições (Lowe-McConnell, 1987; Barthem & Goulding, 1997). Deste modo, os resultados obtidos podem ser meramente em virtude da estratégia de pesca utilizada (Vazzoler, 1996), pois pode haver uma distribuição espacial do *H. marginatus* estratificada por sexo. No entanto, uma proporção maior de fêmeas de *H. marginatus* já foi reportada em outros estudos feitos com desembarque na Amazônia Central (Carvalho, 1980; Cutrim & Batista, 2005) e pode se tratar de uma característica da espécie.

Observamos também que a espécie não apresenta dimorfismo sexual, mas as fêmeas apresentavam Ct e Mt superiores aos dos machos. Esta característica já havia sido descrito para diversas outras espécies tropicais de importância comercial, tais como: o cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Romagosa *et al.*, 2003) e *Prochilodus scrofa* (Godinho & Ribeiro, 1985).

O *H. marginatus* possui fecundidade relativamente baixa quando comparado a outras espécies de peixes tropicais migradores. O IGS médio máximo das fêmeas, registrado na época de desova (no mês de dezembro de

2011/próximo de 3,0 e em 2012, 2013 foi em torno de 2,0), foi muito inferior ao de outras espécies migradoras nativas registradas na época de desova, como o *P. lineatus* (~25,0) (Hainfellner *et al.*, 2012), o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (~20,0) (Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012) e o *P. fasciatus* (20,0) (Romagosa *et al.*, 2003). Embora essa característica possa gerar um baixo número de ovos liberados por fêmea, por outro lado constitui-se em uma vantagem significativa na fase de engorda porque as fêmeas não gastariam supostamente tanta energia com a elaboração dos produtos gonadais, como ocorre em outras espécies usadas no cultivo, convertendo mais energia e materiais no crescimento da massa corporal. Esta conversão de energia em produtos gonadais também foi observada em *P. lineatus* com a relação inversamente proporcional do IGS e IVS (Hainfellner *et al.*, 2012).

Os valores observados para os índices corpóreos indicam que a época de desova desta espécie é similar à de outras espécies reofílicas tropicais e ocorre entre a primavera e verão (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007). No caso das fêmeas de *H. marginatus*, a elevação dos valores médios de IGS entre novembro e dezembro e a consecutiva redução após dezembro, em dois ciclos reprodutivos consecutivos, indica que a desova ocorre entre dezembro e janeiro, no local de estudo. Analisando conjuntamente todo o período de estudo, e considerando diferenças entre os diversos anos analisados, podemos considerar que o ciclo reprodutivo da espécie no local de estudo inicia-se com a maturação entre outubro e novembro, apresenta um curto período de desova entre dezembro e janeiro, o qual é seguido por um período de atresia ovariana entre janeiro e abril e finalmente finaliza com um longo período de repouso que vai de março à outubro, com pequenas variações anuais. As fêmeas que se encontraram com ovários maduros no mês de abril de 2013 certamente não desovariam e teriam seus ovários entrando no processo de atresia. Estes dados podem ser inferidos pela presença de fêmeas atrésias no mês de janeiro de 2013 e ausência de machos liberando sêmen neste período (dados não apresentados).

Um estudo realizado com *H. edentatus* no lago do Castanho, município do Carreiro (AM), mostrou um padrão de ciclo reprodutivo diferente do que

encontramos na barragem de Tucuruí para *H. marginatus* (Carvalho, 1980). De acordo com o autor, a desova ocorre entre fevereiro e maio, portanto pelo menos 02 meses após o período descrito por nós na barragem de Tucuruí (dezembro). No estudo realizado por Carvalho (1980), apenas o IGS e a aparência macroscópica dos ovários foi considerada para estabelecer as classes reprodutivas (Vazzoler, 1996). Mesmo considerando que os autores não realizaram análises histológicas para confirmar os estágios das gônadas, observamos diferenças marcantes nos dados de IGS entre os dois locais de coleta. Assim, enquanto no mês de dezembro de 2011 o IGS médio (~2,8) na barragem de Tucuruí foi o maior observado durante o estudo, no lago do Castanho o IGS médio foi 0,9 no mesmo período (Carvalho, 1980); de acordo com o autor, os maiores valores médios de IGS (~3,4) foram encontrados de fevereiro a abril, e não em dezembro como no nosso estudo. Assim, nossas análises indicam o período reprodutivo na barragem de Tucuruí (dezembro) ocorre antes da descrita no lago do Castanho (fevereiro a abril).

Estes achados indicam que o *H. marginatus* possui diferentes épocas de desova dependendo da região. As diferenças na época de desova têm profundas implicações para estratégias de conservação da espécie, como por exemplo, no estabelecimento de distintas épocas de defeso ou quando se fosse determinar uma possível época de desova induzida em cativeiro. Outro aspecto relevante é a ocorrência provável de distintas populações da mesma espécie, que podem desovar em épocas distintas, como já foi relatado para *Prochilodus lineatus*, na bacia do Rio Mogi-Guaçu em São Paulo (Machado & Foresti, 2012). Desse modo, as variações climáticas, edáficas, limnológicas, hidrológicas e as modificações causadas pelo homem no meio ambiente podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelas diferenças encontradas com relação aos períodos de desova da espécie (Devlin & Nagahama, 2002).

Ainda com relação à época de desova, sabe-se que em ambiente natural a desova ocorre após o pico de IGS (Vazzoler, 1996). A redução do IGS é normalmente atribuída à eliminação dos ovócitos, o que reduz o peso dos ovários. Neste estudo, em Dez/2011, a redução do IGS foi acompanhada pela ocorrência

de fêmeas desovadas com a confirmação histológica da presença de folículos pós-ovulatórios. No entanto, após o pico de IGS em Dez/2012, a mesma redução de IGS não foi acompanhada pela ocorrência de fêmeas desovadas nem pela presença de folículos pós-ovulatórios. Por outro lado, após o pico de IGS de 2012 foram encontradas fêmeas atrésicas. Este fato aliado ao fato das fêmeas desovadas em dezembro de 2011 apresentarem relativamente poucos folículos pós-ovulatórios (sempre inferior a 5 %) e grandes quantidades de ovócitos vitelogênicos completos (sempre superior a 50%) podem indicar falhas no processo de desova na região da barragem. De todas as fêmeas amostradas, apenas aquelas coletadas no mês de dezembro de 2011 apresentaram folículos pós-ovulatórios, que é o indicativo definitivo de desova (Ganias, 2012). Assim, foi constatado que em uma época de desova poucos folículos foram ovulados (dezembro de 2011) e na seguinte (dezembro de 2012) nenhum folículo foi observado. Uma das questões que poderiam explicar a baixa ocorrência de fêmeas desovadas e de folículos pós-ovulatórios é a presença de uma barragem no local de estudo (Agostinho *et. al.*, 2005; Mérona *et. al.*, 2010; Alho *et. al.*, 2015).

Neste contexto, muito pouco é conhecido sobre o efeito dos barramentos sobre o processo de ovulação e desova em espécies migradores. Sabe-se que quanto menor a quantidade de tributários entre as barragens pior serão as probabilidades de sobrevivência das espécies adaptadas à ambientes lóticos (Mérona *et. al.*, 2010; Liermann *et al.*, 2012; Reynalte-Tataje *et al.*, 2012) e na região deste estudo, os dados observados antes e após o fechamento da barragem de Tucuruí indicam que diversas espécies, entre elas algumas migradoras, desapareceram após o fechamento do reservatório (Mérona *et al.*, 2010; Alho *et. al.*, 2015). Tabaranas, *Salminus hilarii*, estudadas em regiões de barramentos do rio Tietê em São Paulo, apresentaram folículos pós-ovulatórios, porém a frequência destes não foi aferida. Mesmo assim, os autores, comparando tabaranas de cativeiro e de regiões de barramentos, reportaram um elevado percentual de ovócitos atrésicos nos ovários daquelas que ocorrem em regiões de barramentos, fenômeno que poderia estar ocorrendo em função do bloqueio da migração (Honji *et al.*, 2009).

Recentemente observamos que ovários pós-desova de fêmeas de *P. mesopotamicus* (Criscuolo-Urbinati, *et al.*, 2012), e *L. macrocephalus* (Pereira, 2013), hormonalmente induzidas com EBHC, apresentam cerca de 20 e 15% de folículos pós-ovulatórios e 0 e 10% de ovócitos vitelogênicos remanescentes. Apesar da metodologia de contagem destes trabalhos (Criscuolo-Urbinati, *et al.*, 2012; Pereira, 2013) ter sido um pouco distinta, pois considera também o volume das estruturas, os percentuais médio dos folículos pós-ovulatórios em ovários pós-desova de *H. marginatus* foram seguramente muito inferiores (próximos à 4%). Em contrapartida, o percentual de ovócitos vitelogênicos remanescentes em ovários pós-desova foram extremamente elevados no *H. marginatus* e mantiveram-se sempre acima de 50%. Assim, analisando os dados de forma conjunta é razoável supor que as fêmeas de *H. marginatus* desovadas, que foram coletadas neste estudo, apresentaram baixas taxas de ovulação quando comparada com outras espécies tropicais migradoras já estudadas.

Existe a possibilidade não confirmada do *H. marginatus* apresentar desova parcelada. Para esclarecer este aspecto, primeiramente seria necessário considerar o tipo de desenvolvimento ovocitário da espécie em questão (Vazzoler, 1996). A maioria dos peixes sul-americanos de água doce com interesse para a aquicultura é migrador, apresenta mecanismo de desenvolvimento ovocitário “sincrônico em dois grupos” e desova do tipo total. Entre diversas espécies com desenvolvimento ovocitário deste tipo, destacamos os chamados “peixes redondos”, como por exemplo, o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Vieira *et al.*, 1999), e o pacú, *P. mesopotamicus* (Romagosa *et al.*, 1993); os representantes do gênero *Brycon*, tais como o matrinxã, *Brycon amazonicus* (Romagosa *et al.*, 2002) e a piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Ganeco *et al.*, 2001); e os grandes bagres Siluriformes, entre eles o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Crepaldi *et al.*, 2006) e o *P. fasciatum* (Romagosa *et al.*, 2003). Nestas espécies, em linhas gerais, os ovários maduros apresentam dois lotes de ovócitos, um de ovócitos maduros para desova eminente e outro de ovócitos pré-vitelogênicos, os quais serão recrutados para a estação reprodutiva seguinte.

Assim, ao analisarmos o ciclo reprodutivo do *H. marginatus*, nos deparamos com uma situação diferente das demais descritas até o momento. A maioria das descrições, em peixes tropicais, de desova parcelada reporta uma longa estação de desova, a qual normalmente apresenta um pico de intensificação de desovas. Normalmente, estas espécies apresentam um pico de IGS com um percentual elevado de fêmeas desovadas durante a primavera-verão, e este pico normalmente ocorre próximo ao mês de outubro e já foi descrito para as seguintes espécies: o pacu-cd, *Metynnis maculatus*, (Pereira *et al.*, 2013), o birú, *Cyphocharax voga*, (Schifino *et al.*, 1998) e *Cyphocharax modesta* (Barbieri, 1995), o sagüiru, *Steindachnerina insculpta*, (Ribeiro *et al.*, 2007) e na piranha, *Serrassalmus spilopleura*, (Lamas & Godinho, 1996). O padrão de desenvolvimento ovocitário e ciclo reprodutivo que observamos no *H. marginatus* não apresenta estas características mencionadas acima, uma vez que não encontramos uma longa estação de desova. No caso do *H. marginatus* os folículos pós-ovulatórios foram encontrados exclusivamente em dezembro e os ovócitos maduros foram encontrados apenas de novembro a janeiro, caracterizando uma curta estação de desova (típico de peixes de desova total).

O perfil de IHS e IVS no *H. marginatus* apresenta o mesmo padrão observado para outras espécies coletadas em ambiente natural. Neste estudo, observamos uma concomitante redução do IGS, IVS e IHS. Sabe-se que em ambiente natural existe um gasto de energia, seja com a busca por alimento, migração, ou estresse pela competição. Nesses casos, se a reserva lipídica não for suficiente para a formação das gônadas, o animal pode até utilizar tecido muscular (Wiegand, 1996), justificando assim a redução nestes índices, o que parece estar ocorrendo com o *H. marginatus*. Como os índices são calculados pela relação massa do órgão/massa do animal, os resultados podem variar muito quando não se conhece as condições do animal. Em situações controladas, as variáveis são minimizadas, a alimentação é fornecida, a competição é muito menor, não existem predadores, portanto a energia é dirigida para a formação das gônadas (Bazzoli, 1985; Agostinho *et al.*, 1990). Essa condição sugere que a diminuição relativa massa do fígado está relacionado ao processo de vitelogênese. Verifica-se a mobilidade de volume das vísceras e fígado durante o

desenvolvimento ovariano em cativeiro (Hainfellner *et al.*, 2012). Em situações favoráveis (cultivos com boas práticas de manejo), as reservas lipídicas do fígado e vísceras formam uma curva inversamente proporcional ao IGS (Sheridan, 1994; Yoneda *et al.*, 1998 e Romagosa *et al.*, 2003).

O período do desenvolvimento gonadal, a intensidade e a duração em que ocorre o estresse são fatores importantíssimos a serem considerados. Estes fatores podem levar a respostas completamente diferentes dependendo das estratégias reprodutivas das espécies, podendo uma fêmea gastar a energia para a manutenção e crescimento somático, ou para a reprodução. De acordo com Roff (1982), a distribuição de energia durante a reprodução pode ser usada na manutenção da massa corporal e do ajustamento da produção de gametas ou na manutenção do número constante de ovos à custa dos tecidos somáticos. No primeiro caso, ocorre o comprometimento do desenvolvimento do ovário durante a vitelogênese, o que resulta em atresia do ovo e reabsorção subsequente. O segundo poderia acontecer quando o tecido somático é severamente afetado durante a pré-desova, mas o número e a qualidade dos ovos permanecem constantes. Assim, no caso do *H. marginatus*, a redução do IHS e IVS concomitante com a redução de IGS mostra que, no período da reprodução, os indivíduos apresentam gastos energéticos consideráveis com outras atividades (sendo eles provavelmente migração, busca de alimentos, fuga de predadores, ou mesmo a natação contínua em frente à barragem).

As análises histológicas e dos índices mostram que a espécie apresenta um longo período de repouso e uma rápida vitelogênese que ocorre em novembro, um mês antes do período de desova. Durante a vitelogênese, sabe-se que na maioria das espécies estudadas o FSH é responsável pela elevação de E_2 . Neste contexto, sabe-se que o FSH liberado na corrente sanguínea estimula as células da camada teca (folículo ovariano), que convertem o colesterol em testosterona, por sua vez a testosterona é transportada até as células da camada granulosa onde é aromatizada em E_2 . No fígado o E_2 é responsável por promover a síntese de vitelogenina (Nagahama, 1994). Assim, neste estudo corroboramos uma possível associação entre os níveis anuais da expressão gênica de *fsh* e as

concentrações plasmáticas de E_2 . Observamos que a expressão gênica do *fsh* aumenta gradativamente entre Jun/2013 e Dez/2013 associando-se com parte do período de atividade vitelogênica e pico de E_2 . Portanto é possível que nesta espécie o FSH tenha o mesmo papel já descrito em outras espécies em regular a síntese de E_2 , porém de forma mais abrupta fazendo com que a maturação ocorra em apenas um mês (novembro). Neste estudo não encontramos um “gatilho claro” que possa ter estimulado elevações na expressão gênica de *fsh*, uma vez que os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se constantes o ano todo. O pico de E_2 entre Nov/2012 e Dez/2012 está associado ao início da vitelogênese neste período, mas o mesmo não foi observado em 2013, quando o período vitelogênico não foi acompanhado por elevações de E_2 . Estas incongruências encontradas em ciclos reprodutivos consecutivos podem ser explicadas pelo fato de numa mesma coleta terem sido encontrados exemplares em diversas classes de maturação. Esta característica corrobora a existência de provavelmente mais de uma população no local (desovando em períodos distintos), fomenta a favor de uma desova do tipo parcelada e da possibilidade da interferência negativa dos barramentos (Mérona *et. al.*, 2010; Alho *et. al.*, 2015).

O período de desova, sabe-se que a principal substância associada com a ovulação e desova eminente é a MIS (Arantes *et al.* 2010). O pico da MIS do mapará encontrado em Nov/2012 associou-se com o período de desova da espécie, no entanto o mesmo pico não foi encontrado em Dez/2013. Da mesma forma, com dito anteriormente, a heterogeneidade de classes de maturação encontrada em uma mesma coleta e a provável ocorrência de mais de uma população podem explicar a incongruência de padrões entre dois ciclos reprodutivos consecutivos. Com relação à 17α -OHP sabe-se que esta substância é a principal precursora da MIS. Na camada Teca, a 17α -OHP é transportada até células da camada granulosa onde é convertida em MIS pela enzima 20β -HSD (Nagahama, 1997). Entre Nov/2012 e Abr/2013, período que compreende o período de desova e pós desova, o perfil da MIS foi inverso ao da 17α -OHP, indicando que a última possa de fato ter servido como substrato para a formação da primeira.

Concluindo, a espécie apresenta ciclo reprodutivo similar ao de outras espécies migradoras com desova total, com algumas particularidades. A espécie apresenta longo período de repouso, porém a vitelogênese e possivelmente o período de desova são curtos e ocorrem no mês de novembro e dezembro respectivamente. As análises histomorfométricas demonstraram que os ovários de mapará iniciam processo de atresia a partir de janeiro. De posse destas informações, concluímos que, na região do estudo, é possível que o mapará está tendo seu ciclo reprodutivo parcialmente interrompido devido à presença da barragem. A ocorrência de matrizes durante o ano todo, na região do estudo, pode estar associada às variações diárias e semanais artificiais do fluxo de água, relacionado à demanda energética. Nesta espécie, pelo menos em um dos ciclos reprodutivos analisados, os níveis de gonadotrofinas e esteroides gonadais se associam, similar a outras descrições em peixes, com os eventos de vitelogênese e desova.

REFERÊNCIAS

- Agostinho AA, Barbieri G, Verani JR, Hahn NS. 1990. Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) no Rio Paranapanema, Porecatu. *Ciência e Cultura*, v.42, p.711-714.
- Agostinho AA, Thomaz SM, Gomes LC. 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, 1:1, 70-78.
- Alho CJ, Reis RE, Aquino PP. 2015. Amazonian freshwater habitats experiencing environmental and socioeconomic threats affecting subsistence fisheries. *Ambio*, 1-14.
- Alvarenga ER, França LR. 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.
- Arantes FP, Santos HB, 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.
- Barbieri G. 1995. Biologia populacional de *Cyphocarax modesta* (HENSEL, 1869) (Characiformes, Curimatidae) da represa do lobo (Estado de São Paulo) II. Dinâmica da reprodução e influência de fatores abióticos. *Boletim do Instituto de Pesca*, 22: 57 – 62.
- Barthem R. & Goulding. M. 1997. *The catfish connection*. University Press, New York. 144p.
- Bazzoli N. 1985. Biologia reprodutiva do peixe-cachorro *Acestrorhynchus lacustris* (Reinhardt, 1874) (Characidae, Acestrorhynchinae) da Represa de Três Marias, Rio São Francisco, MG. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 149p.

- Bogerd J, Blomenrohr M, Andersson E, van der Putten HH, Tensen CP, Vischer HF, Granneman JC, Janssen-Dommerholt C, Goos HJ, Schulz RW. 2001. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). Biol Reprod. 64, 1633-1643.
- Carvalho FM. 1980. Composição química e reprodução do mapará (*Hypophthalmus edentatus* Spix, 1829) do lago do Castanho, Amazonas. (Siluriformes, Hypophthalmidae). Acta amazônica, 10 (2): 379-389
- Carvalho JL & Merona B. 1986. Estudos sobre dois peixes migratórios do baixo Tocantins, antes do fechamento da barragem do Tucuruí. Amazoniana, 4: 595-607.
- Cintra IHA, Juras AA, Andrade JAC, Ogawa M. 2007. Caracterização dos desembarques pesqueiros na área de influência da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Estado do Pará, Brasil. Boletim Técnico-Científico do CEPNOR, 7: 135-152
- Costa, 2006
- Crepaldi DV, Faria PMC, Teixeira TA, Ribeiro LP, Costa AAP, Melo DC, Cintra APR, Prado SA, Costa FAA, Drumond ML, Lopes VE, Moraes VE. 2006. Biologia reprodutiva do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*). Revista Brasileira de Reprodução Animal, 30: 159-167.
- Criscuolo-Urbinati ER, Kuradomi Y, Urbinati EC, Batlouni SR. 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Theriogenology, 78: 2087 – 2094.
- Cutrim L & Batista VS. 2005. Determinação de idade e crescimento do mapará (*Hypophthalmus marginatus*) na Amazônia Central. Acta Amazônica, 35: 85 – 92.
- Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208: 191 – 364.
- Ganeco LN, Nakaghi LSO, Urbinati EC, Dumont-Neto R, Vasques LH. 2001. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon*

- orbignuanus*, durante o ciclo reprodutivo. Boletim do Instituto de Pesca, 27: 131-138.
- Ganias, K. 2012. Thirty years of using the postovulatory follicles method: Overview, problems and alternatives. Fisheries Research, 117: 63-74.
- Godinho HP & Ribeiro DM. 1985. Maturidade sexual de curimatás, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Teleostei) em viveiros. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 34: 349-357.
- Gonçalves C & Baptista VS. 2008. Avaliação do desembarque pesqueiro efetuado em Manacapuru, Amazonas, Brasil. Acta Amazônica, 38: 135-144.
- Hainfellner P, de Souza T, Moreira RG, Nakaghi LSO, Batlouni SR. 2012. Low estradiol levels, delayed vitellogenesis and reduced amounts of yolk are dysfunctions associated with the formation of low quality oocytes in *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Characiformes). Neotropical Ichthyology, 10: 601-612.
- Honji RM, Narcizo AM, Borella MI, Romagosa E, Moreira RG. 2009. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). Fish Physiology and Biochemistry, 35:109–123.
- Lamas IR & Godinho AL. 1996. Reproduction in the piranha *Serrassalmus spilopleura*, a neotropical fish with an usual pattern of sexual maturity. Environmental Biology of Fishes, 45: 161-168.
- Liermann CR, Nilsson C, Robertson J, Rebecca Y Ng. 2012. Implications of Dam Obstruction for Global Freshwater Fish Diversity. BioScience, 62: 539-548.
- Lowe-McConnell RH. 1987. Ecological Studies in Tropical Fish Communities. University Press, Cambridge. 382p.
- Lyons J, Navarro-Pérez S, Cochran PA, Santana EC, Guzmán-Arroyo M. 1995. Index of Biotic Integrity Based on Fish Assemblages for the Conservation of Streams and Rivers in West-Central Mexico. Conservation Biology, 9:3, 569-584.

- Machado MRF & Foresti F. 2012. Morphometric characteristics of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1847), of the migratory and resident stocks of the river Mogí-Guaçu, São Paulo State, Brazil. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 34: 341-346.
- Mérona B, Juras AA, Santos GM, Cintra IHA. 2010. Os peixes e a pesca no baixo rio Tocantins: 20 anos depois da UHE Tucuruí. 208p. Eletrobrás Eletronorte, Belém. 256p.
- Ministério da pesca e aquicultura – MPA. 2012. dados. <<http://www.mpa.gov.br/>>.
- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis *International Journal of Developmental Biology*. 38. 217-229.
- Nagahama Y. 1997. 17a.20B, dihydroxy-4-pregnen-3-one maturation inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62: 190- 196p.
- Nakatani K, Baumgartner G, Latini JD. 1998. Morphological description of larvae of the mapará *Hypophthalmus edentatus* (Spix) (Osteichthyes, Hypophthalmidae) in the itaipu reservoir (Paraná River, Brazil). *Revista Brasileira Zoologia*. 15:3, 687-696.
- Pereira TSB. 2013. Efeito de diferentes indutores hormonais sobre o processo de maturação final e ovulação em *Leporinus macrocephalus*. tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal. 45p.
- Pereira TBS, Moreira RG, Batlouni SR. 2013. Dynamics of ovarian maturation during the reproductive cycle of *Metynnis maculatus*, a reservoir invasive fish species (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, *in press*.
- Reynalte-Tataje DA, Nuñez APO, Nunes MC, Garcia V, Lopes CA, Zaniboni-Filho E. 2012. Spawning of migratory fish species between two reservoirs of the upper Uruguay River, Brazil, 10: 829-835.
- Ribeiro VMA, Santos GB, Bazzoli N. 2007. Reproductive biology of *Steindachnerina insculpta* (Fernandez-Yépez) (Teleostei, Curimatidae) in

- Furnas reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 24: 71-76.
- Roff DA. 1982. Reproductive strategies in flatfish: a first synthesis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 39: 1686-1698.
- Romagosa E, Narahara MY, Godinho HM, Paiva P, Braga FMS. 1993. Mudanças morfológicas dos ovários de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), em condições de confinamento. *Boletim do Instituto de Pesca*, 20: 67-80.
- Romagosa E, Borella MI, Narahara MY, Fenerich-Verani N. 2002. Light and electron microscopy of oogenesis in matrinxã, *Brycon cephalus*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 34: 425-431.
- Romagosa E, de Paiva P, Godinho HM, Andrade-Talmelli EF. 2003. Características morfométricas e crescimento do cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linneaus, 1766), mantido em confinamento. *Acta Scientiarum*, 25: 277- 283.
- Schifino LC, Cabral L, Fialho CB, Verani JR. 1998. Reproductive aspects of *Cyphocharax voga* (Hensel) from Custódias lagoon, Rio Grande do Sul, Brazil (Characiformes, Curimatidae). *Revista brasileira de Zoologia*, 15: 767- 773.
- Sheridan MA. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1107B: 495-508.
- Silva TCGD, Cavalcante DP, Queiroz HLD. 2014. Aspects of the reproductive biology of *Aequidens tetramerus* (Cichlidae) in várzea areas of the middle solimões river, brazilian amazon. *Uakari*, 9:2, 63-74
- Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA. 2008. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34: 95-101.
- Tolmasquim MT. 2012. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. *Estudos Avançados*, 74: 247-260.

- Vazzoler AE. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. EDUEM, São Paulo. 169 p. ISBN 85-85545.
- Vieira EF, Isaac VJ, Fabr e NN. 1999. Biologia reprodutiva do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalminidae), no baixo amazonas, Brasil. Acta Amaz nica, 29: 625-638.
- Wiegand MD. 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 6:259-286.
- Yoneda M, Tokimura M, Fujita H, Takeshita N, Takeshita K, Matsuyama S, Matsuura S. 1998. Reproductive cycle and sexual maturity of the anglerfish *Lophiomus setigerus* in the East China Sea with a note on specialized spermatogenesis. Journal of Fish Biology, 53: 164-178.
- Zaniboni-Filho E & Weingartner M. 2007. T cnicas de indu o da reprodu o de peixes migradores. Revista Brasileira de Reprodu o Animal, 31: 367-373

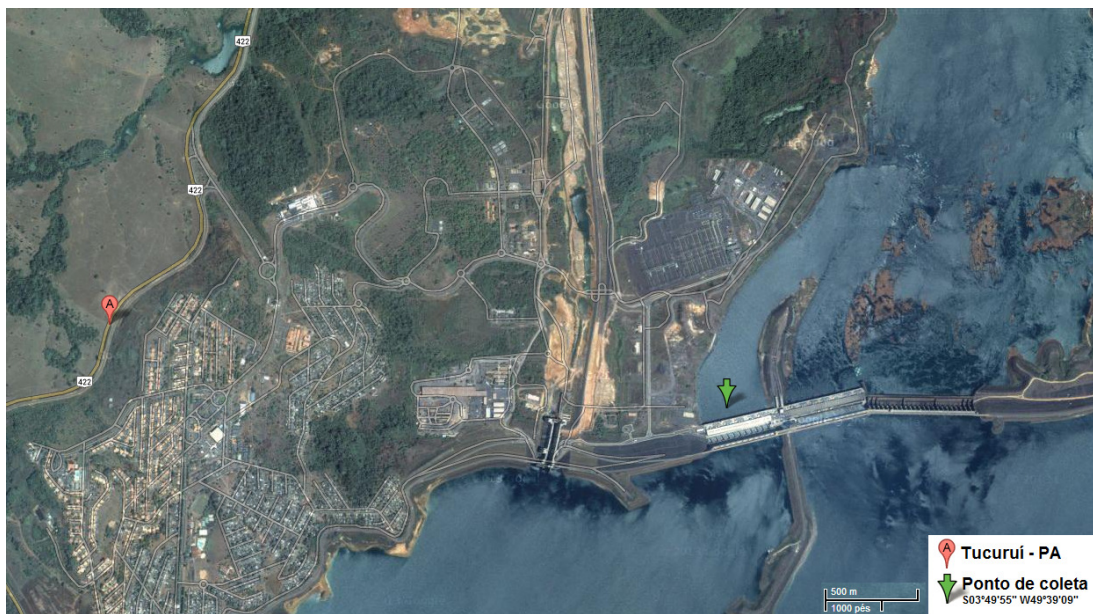


Figura 1. Imagem digital obtida por satélite mostrando o local de captura dos maparás deste trabalho. Fonte: Dados cartográficos ©2013 Google.

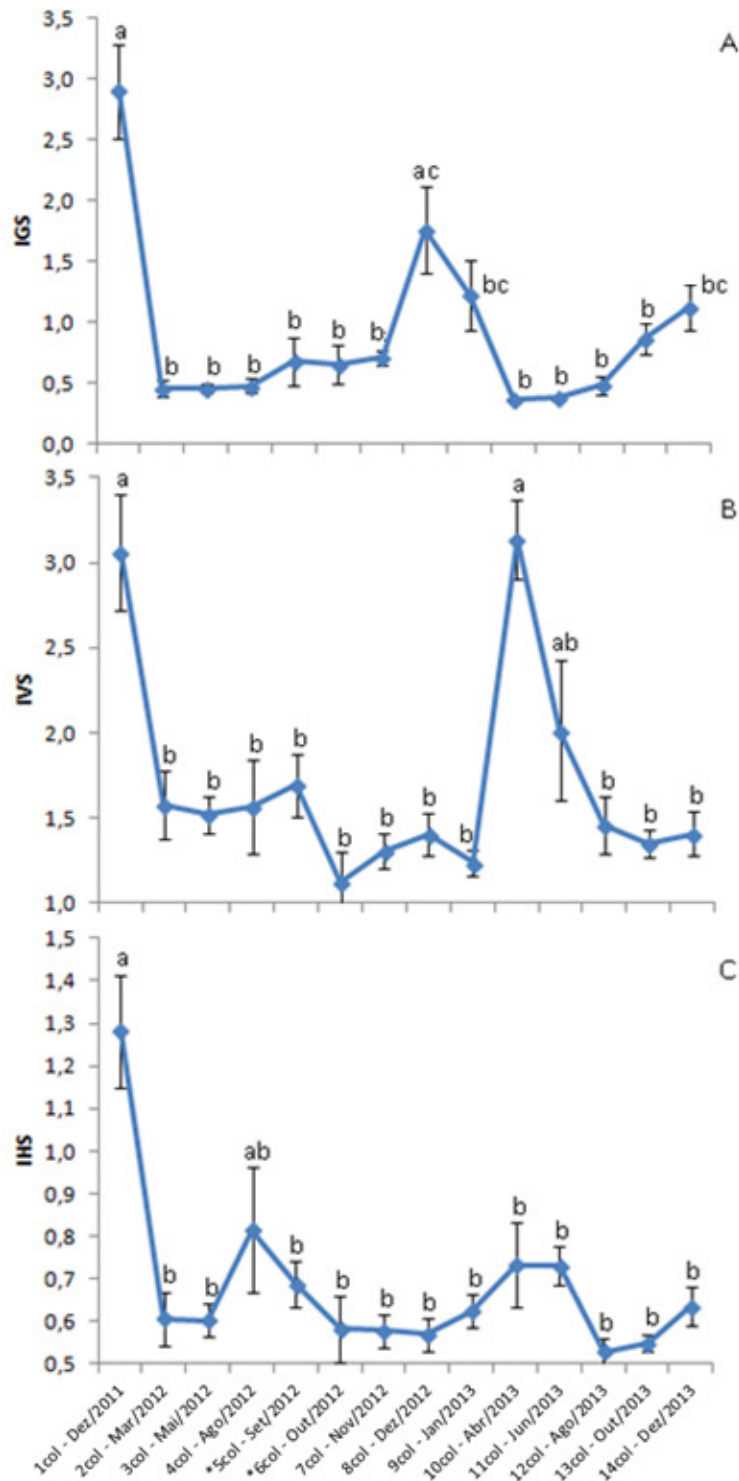


Figura 2. Variação temporal da média dos índices corpóreos de fêmeas de mapará, com erro padrão, (A) Índice gonadossomático (IGS). (B) Índice viscerossomático (IVS). (C) Índice hepatossomático (IHS). Letras diferentes representam valores que diferiram estatisticamente $P < 0.05$ no teste de Tukey.

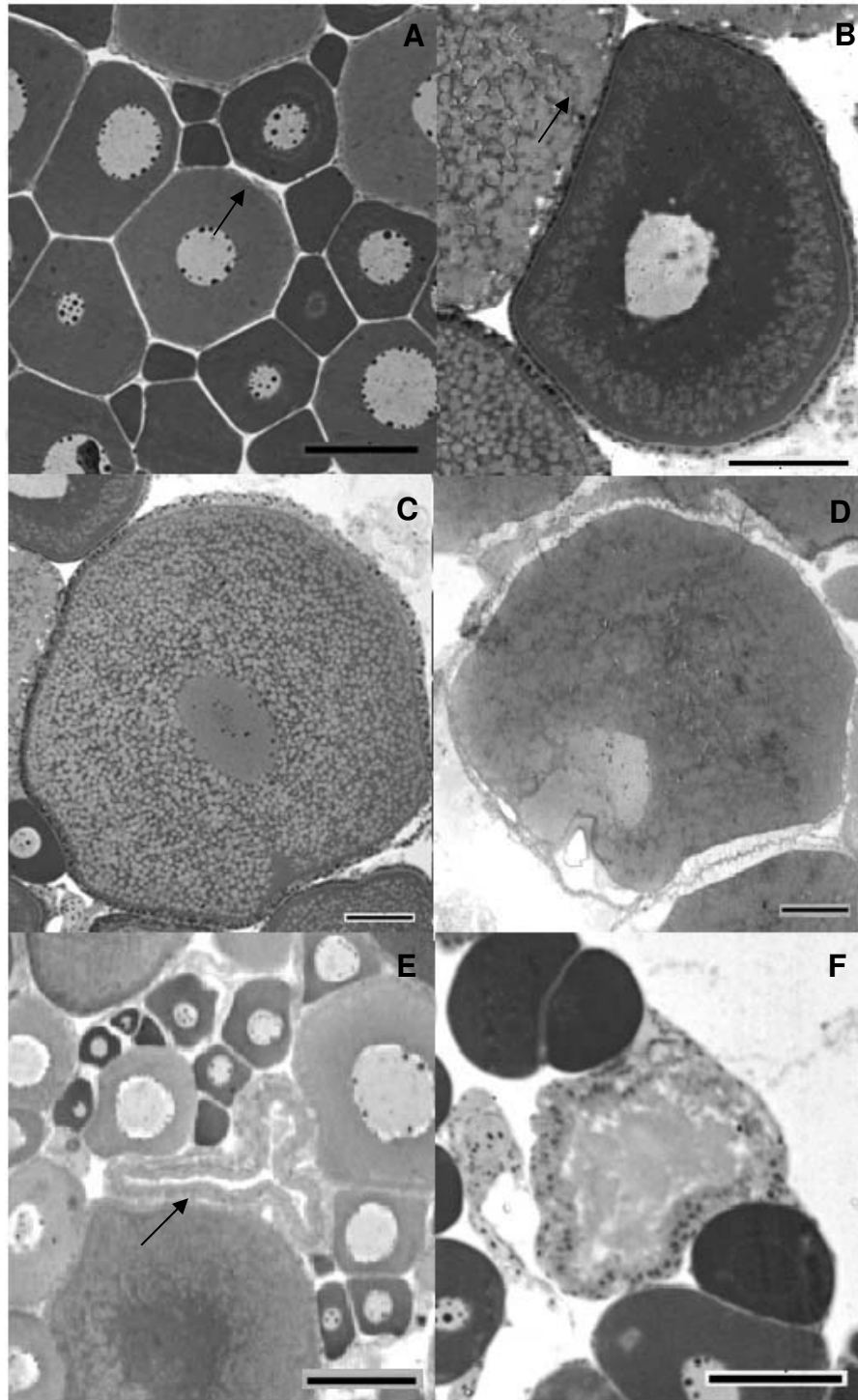


Figura 3. Secções transversais, de ovários de *Hypophthalmus marginatus*, evidenciado os diferentes tipos de ovócitos. (A) Ovócitos pré-vitelogênicos. (B) Álveolo-cortical. (C) Vitelogênico. (D) Vitelogênico com núcleo migrado. (E) (seta) Folículo Pós-ovulatório. (F) Atrésico. Barra=100μm. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Espessura dos cortes: 2μm.

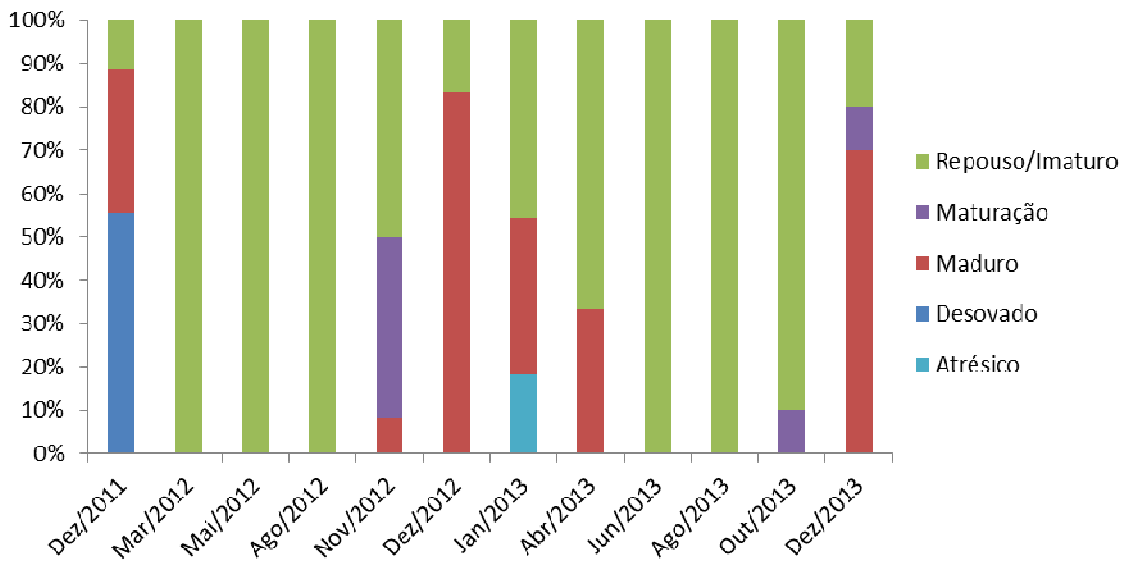


Figura 4. Distribuição percentual de ovários de *Hypophthalmus marginatus* de acordo com a classe de maturação.

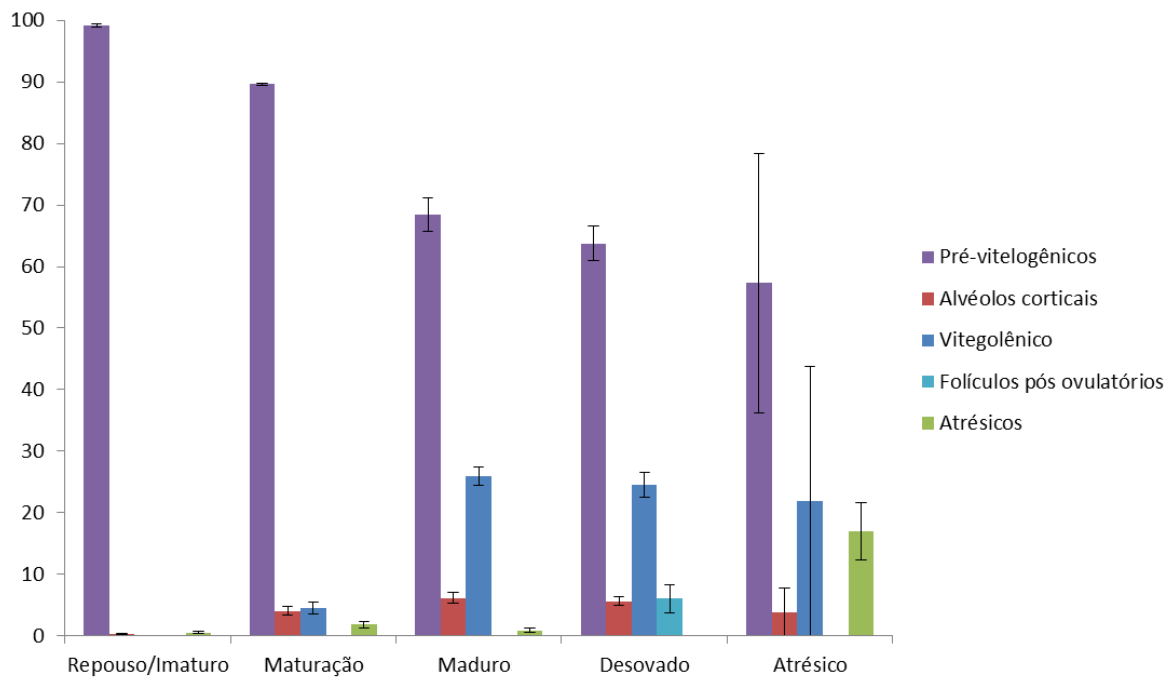


Figura 5. Distribuição percentual dos tipos de ovócitos de acordo com a classe de maturação em ovários de *Hypophthalmus marginatus*. Barras representam erro padrão.

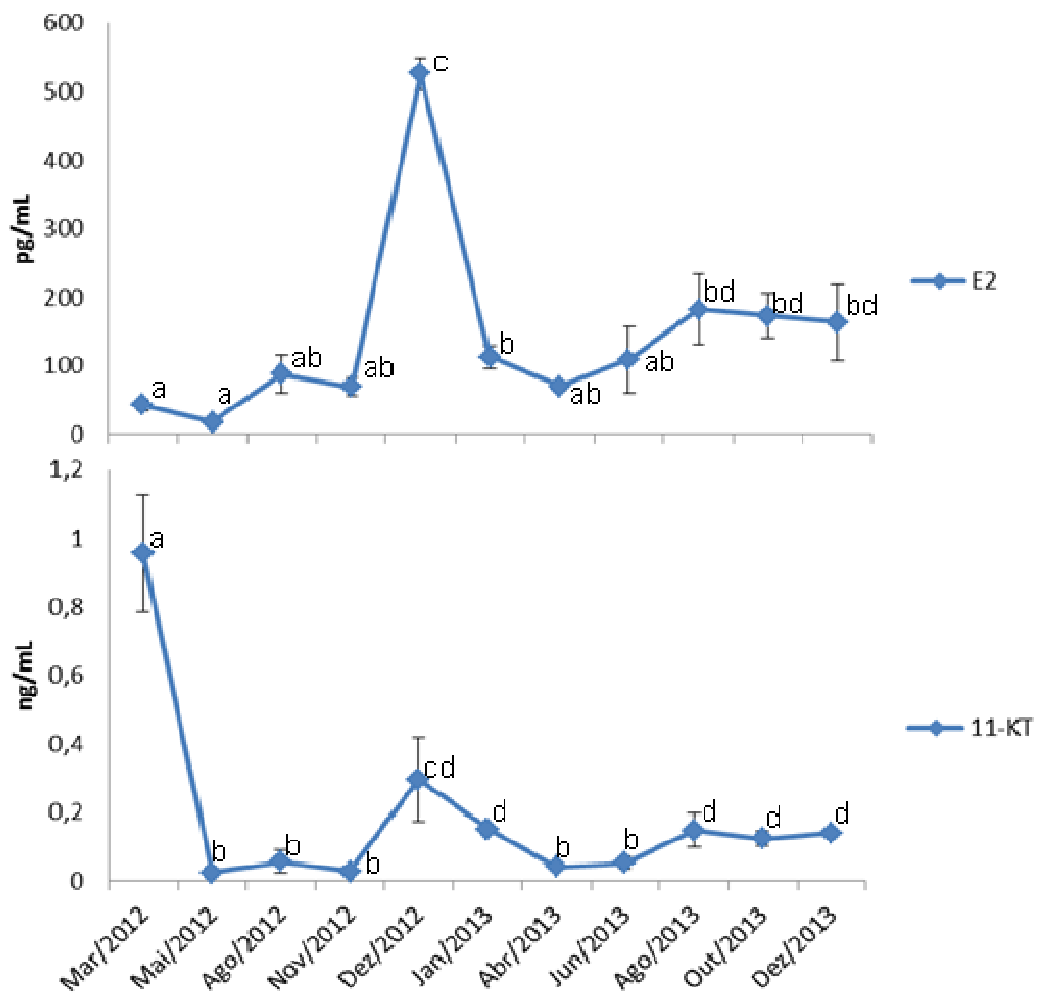


Figura 6. Médias dos valores de concentração plasmática de E₂ (17β-estradiol) e 11-KT(11- Cetotestosterona). Barras representam erro padrão. Letras minúsculas expressam diferença estatística significativa entre médias, ao longo das coletas (teste de Tukey, P < 0,05).

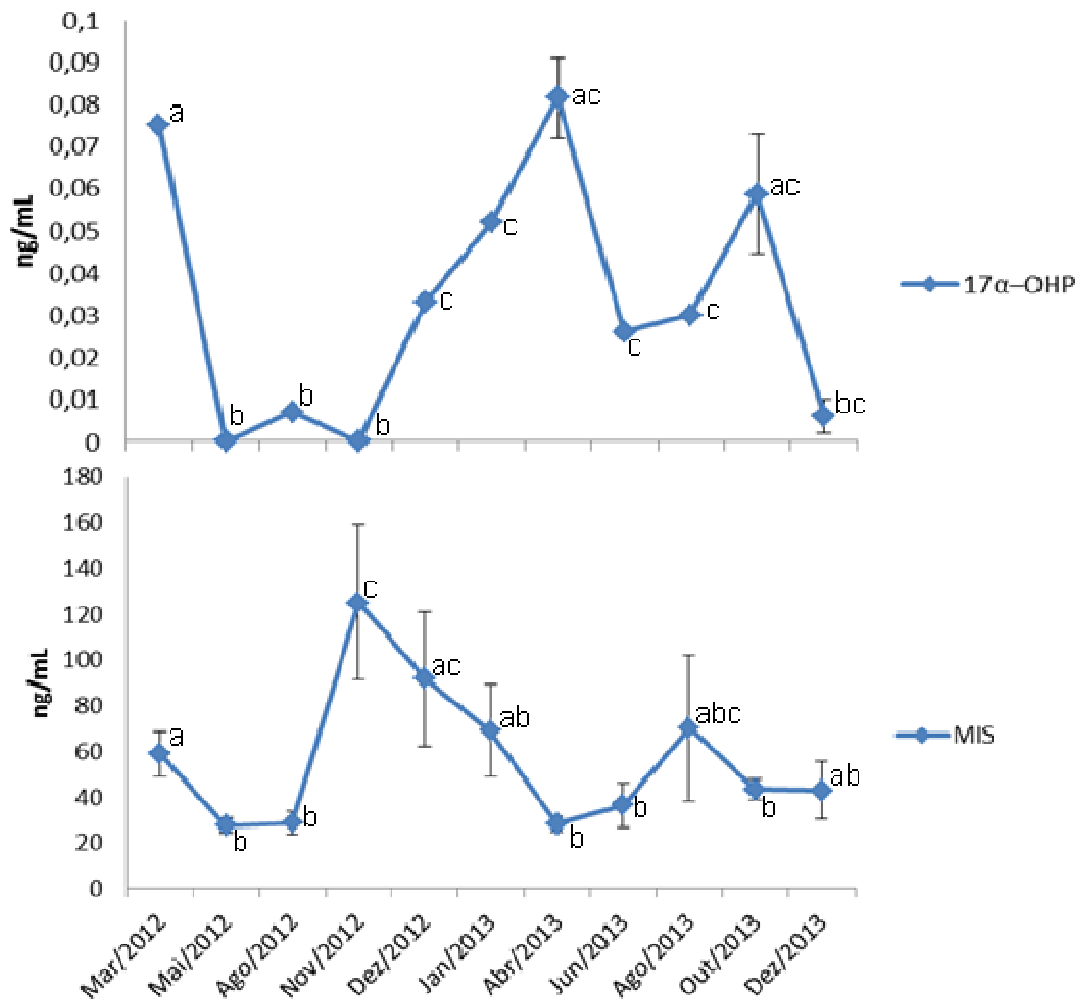


Figura 7. Médias dos valores de concentração plasmática de 17α-OHP(17α-hidroxiprogesterona) e MIS(17α - 20β-dihidroxi-4-pregnen-3-ona). Barras representam erro padrão. Letras minúsculas expressam diferença estatística significativa entre médias, ao longo das coletas (teste de Tukey, $P < 0,05$).

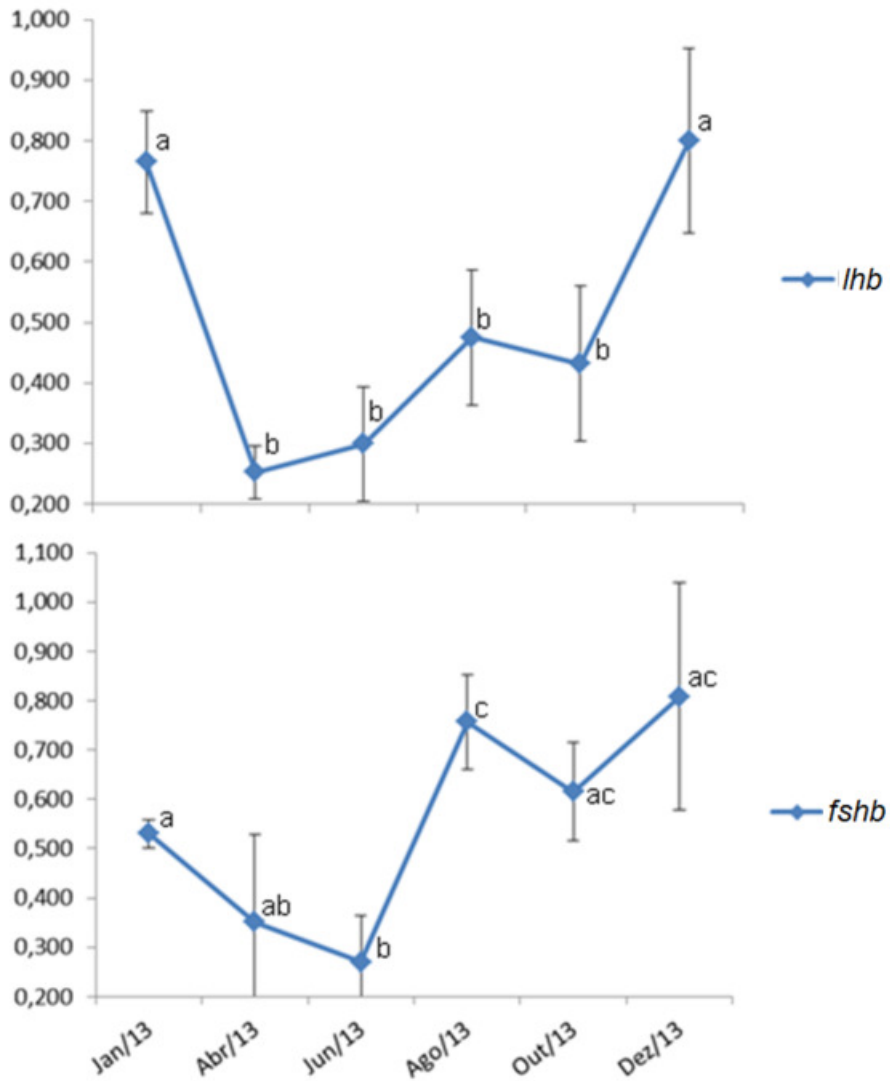


Figura 8. Níveis expressão dos genes *lhb* e *fshb* ao longo do ano de 2013. Barras representam erro padrão. Letras minúsculas expressam diferença estatística significativa entre médias, ao longo das coletas (teste de Tukey, $P < 0,05$).

Tabela I. Oligonucleotídeos iniciadores para a expressão gênica (RT-qPCR) dos genes que codificam para o hormônio luteinizante subunidade beta (*lhb*), hormônio folículo estimulante subunidade beta (*fshb*) e fator de alongação 1 Alfa (*ef1a*).

Genes	Nº acesso	Espécies	senso	anti-senso
<i>fshb</i>	AF325218S1; KF998583; AY973947	<i>Clarias gariepinus</i> ; <i>Hemibagrus nemurus</i> ; <i>Silurus meridionalis</i> ;	GTGTTGCTGTTGCCGATGCT	TGAAGTTGCAGGTGTTCTGGA
<i>lhb</i>	AY973946; KF934190; EF194763; JF340465; AY424305;	<i>Silurus meridionalis</i> ; <i>Hemibagrus nemurus</i> ; <i>Ctenopharyngodon idella</i> ; <i>Gobiocypris rarus</i> ; <i>Danio rerio</i> ;	GGACACTGCTTCACCAAGGAACC	TGAGGTGCCATGGTGACAGGCT
<i>ef1a</i>	AY264196; AY264198; AY264197; JF834099; JF834094;	<i>Hypophthalmus edentatus</i> ; <i>Zungaro zungaro</i> ; <i>Sorubim lima</i> ; <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> ; <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> ;	CTGTTGAAATGCACCACGAGTCTCT	CCTGAGCAGTGAAGCTGCCA

Tabela II. Fêmeas de *Hypophtalmus marginatus* capturados à jusante da barragem de Tucuruí entre os meses de dezembro/2011 e dezembro/2013, utilizados neste estudo. EP: erro padrão

Parâmetros	n	Massa (g) (média ±EP)	Comprimento total (cm) (média ±EP)
Fêmeas			
Dez/2011	9	530,0±54,3	45,9±1,07
Mar/2012	9	450,0±44,5	44,9±1,0
Mai/2012	10	550,0±46,4	48,0±0,8
Ago/2012	15	487,1±43,9	46,8±0,8
Set/2012	10	484,1±56,1	46,3±0,9
Out/2012	9	476,2±42,7	45,9±0,7
Nov/2012	13	541,8±47,5	47,7±1,0
Dez/2012	6	535,0±76,0	44,5±1,2
Jan/2013	11	770,0±45,3	51,0±0,8
Abr/2013	3	453,3±43,3	44,7±0,9
Jun/2013	5	482,0±63,4	45,2±1,6
Ago/2013	4	585,0±53,8	46,0±0,7
Out/2013	17	498,2±23,5	45,9±0,5
Dez/2013	37	591,7±64,5	46,1±1,0
Total	158		

Tabela III. Variações dos parâmetros físicos e químicos da água ao longo de quatro coletas de mapará realizadas na região da barragem de Tucuruí-PA.

Datas	pH	T(°C)	Od. (mg/L)	Cond. (µs)	Transp. (m)
Dez/2011	6,6	29,8	5,7	50,6	2,3
Mar/2012	6,7	28,2	5,6	39,9	1,5
Mai/2012	6,8	31,0	6,2	37,7	1,4
Ago/2012	6,8	29,5	5,9	42,7	1,7
Nov/2012	7,2	31,0	5,3	43,1	1,5
Dez/2012	6,8	30,0	5,7	50,1	2,0
Jan/2013	7,0	31,5	4,7	43,9	1,2
Abr/2013	7,0	29,2	6,5	37,2	1,4
Jun/2013	7,3	29,7	5,2	38,3	1,8
Ago/2013	7,1	29,7	4,7	40,0	1,8
Out/2013	6,8	29,5	5,5	43,0	2,0
Dez/2013	6,7	29,5	5,5	41,0	1,8

T.: Temperatura. Od.: Oxigênio dissolvido. Cond.: Condutividade. Transp.: Transparência.

MANUSCRITO II

**Indução hormonal à desova de matrizes selvagens de mapará
(*Hypophthalmus marginatus*)**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de indução hormonal para as matrizes selvagens de mapará (*Hypophthalmus marginatus*), usando hormônio liberador de gonadotrofina ou extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), com e sem uso de prostaglandina sintética, em diferentes concentrações. Para isto, em duas estações reprodutivas (dezembro de 2012 e 2013) foram feitas expedições para o Rio Tocantins à jusante da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Tucuruí, PA, para coletar matrizes e testar diversos protocolos de indução hormonal. Doze a 15h após a segunda dose hormonal as fêmeas foram submetidas ao processo de extrusão manual. Após o processo de desova, estas foram submetidas à análises biométricas e tiveram seus ovários, hipófise e amostras de sangue coletados. O peso dos animais, de suas gônadas e órgãos foram usados para calcular os índices gônado, viscero e hepatossomático. Amostras dos ovários pós-desova foram submetidas ao processamento histológico para avaliação do efeito dos tratamentos hormonais. Com amostras do sangue coletado foram definidas as concentrações de esteroides gonadais (17 β -estradiol, 11-Cetotestosterona, 17 α -hidroxiprogesterona e 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona). Com as hipófises coletadas foram determinados os valores de expressão gênica da subunidade beta do hormônio foliculo estimulante (*fshb*), subunidade beta do hormônio luteinizante (*lhb*). Foi observado que as fêmeas responderam positivamente ao tratamento de 0,5mg de EBHC/kg de peixe + 3,0mg de EBHC/kg de peixe com 0,5mL de prostaglandina/peixe (intervalo 12h), mas a desova produzida não gerou embriões viáveis, o que ainda demanda mais estudos e tentativas.

Palavras-chave: mapará, desova induzida, extrato bruto de hipófise de carpa, esteroides gonadais, expressão gênica

ABSTRACT

The aim of this research was to develop an induction protocol for wild breeders of mapará (*Hypophthalmus marginatus*) using gonadotropin-releasing hormone or crude carp pituitary extract (EBHC), with or without synthetic prostaglandin, at different concentrations. To this end, during two reproductive seasons (December 2012 and 2013) were made expeditions to the Tocantins River downstream of Tucuruí dam hydroelectric power plant, Tucuruí, PA, to select breeders and test different protocols for hormonal induction. Twelve to 15h after the second hormonal dose females were subjected to manual extrusion process. After the process of spawning, they were subjected to biometric analysis and had their ovaries, pituitary and blood samples collected. The weight of their body, gonads and organs were taken to calculate the gonado, viscera and hepatossomatic indexes. Samples of the post-spawning ovaries were subjected to histological processing to evaluate the effect of hormone treatments. With the blood samples were defined concentrations of gonadal steroids (17 β -estradiol, 11-Cetotestosterona, 17 α -hydroxy-progesterone and 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one). With the pituitary glands were determined gene expression values of the beta subunit of follicle stimulating hormone (*fshb*), beta subunit of luteinizing hormone (*lhb*). It was observed that females responded positively to the treatment 0.5mg EBHC / kg of fish + 3.0mg EBHC / kg fish and 0.5 ml prostaglandin / fish (12h interval), but the spawning produced no viable embryos which still need further studies and attempts.

Keywords: mapará, induced spawning, crude extract of carp pituitary, gonadal steroids, gene expression

INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil o manejo e conservação de recursos aquáticos são baseados em controle de pesca, estocagem e construção de escadas para a transposição de peixes em barragens. Infelizmente estas ações são comprometidas em grande parte por falta de informações científicas e estudos inadequados das populações de peixes e seus respectivos ciclos reprodutivos por região (Agostinho *et al.*, 2005).

A energia elétrica nacional é quase exclusivamente suprida por hidroelétricas (Tolmasquim, 2012). Hoje, no Brasil existe mais de 600 barragens construídas e, com a crescente demanda por energia esse número tende a crescer ainda mais (Agostinho *et al.*, 2005). Na região amazônica existem planos governamentais que prevêem a construção de mais 277 barragens (Castello *et al.*, 2013). Não se sabe exatamente os impactos causados ao ecossistema pelas barragens já construídas, pois muitas delas foram construídas antes de existir alguma base de dados ecológicos (Gunkel *et al.*, 2003), mas foi constatada a diminuição e em alguns casos até a erradicação de algumas espécies de peixes, principalmente espécies reofílicas (Agostinho *et al.*, 2005).

As barragens não só impedem a migração de peixes, mas também modificam todo ecossistema, dividem o rio em dois ambientes distintos: montante, caracterizada por ambiente lacustre, favorece o desenvolvimento de espécies lênticas (Mérona *et al.*, 2010); jusante, áreas com volume de água que varia diariamente formando corredeiras, favorece o desenvolvimento de espécies lóticas, mas a maioria destas espécies são migradoras e desta forma não completam o ciclo reprodutivo ao atingir a barragem (Mérona *et al.*, 2010; Alho *et al.*, 2015).

O mapará (*Hypophtalmus marginatus*) é uma das principais espécies de importância pesqueira na região amazônica (Cintra *et al.*, 2007 e Gonçalves & Baptista 2008), figurando entre uma das cinco espécies mais abundantes nos desembarques de pescado (Gonçalves & Baptista, 2008). Apesar de sua

destacada importância e de ser intensamente explorado nos mercados nacionais (principalmente no sudeste) (Cutrim & Baptista, 2005) e internacionais (Costa, 2006), não se encontram dados na literatura sobre sua reprodução ou produção de alevinos para conservação da espécie ou produção aquícola.

O mapará é uma espécie reofílica (Carvalho & Merona, 1986), que, assim como as outras na natureza, se agrupa em grandes cardumes por volta do mês de novembro para realizar a piracema, migração sincronizada que atinge seu auge entre os meses de novembro a janeiro com a desova junto à cabeceira dos rios (Godinho *et al.*, 2007; Zaniboni-Filho & Weingarner, 2007).

Estudos realizados na hidroelétrica de Tucuruí, no Baixo Rio Tocantins, mostram que após 20 anos da sua construção a população de maparás vem diminuindo drasticamente. De 1981-1989 a captura de maparás na jusante correspondia a mais de 25% (peixe de maior importância) de todo pescado capturado, mas de 1989-2005 a captura de maparás passou a corresponder 10% (passou a ser um dos peixes de menor importância). Em contra partida, a pescada branca (*Plagioscion squamosissimus*), espécie mais adaptada a ambientes lenticos, que antes tinha a importância de menos de 5% (1981-1989), passou a corresponder a 25% do pescado (2004-2005) (Mérona *et al.*, 2010). Especula-se que com o ciclo reprodutivo interrompido pela barragem, é uma questão de tempo para o mapará ser mais uma das espécies erradicadas à jusante da barragem de Tucuruí (Alho *et al.*, 2015).

As espécies reofílicas têm seus ciclos reprodutivos controlados endogenamente por um sistema endócrino, principalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que sintetiza e libera gonadotropinas, esteróides gonadais e hormônios moduladores do processo reprodutivo (Weltzien *et al.*, 2004; Mylonas *et al.*, 2010). Neste processo o desenvolvimento das gônadas, maturação, liberação e fertilização dos gametas ocorrem em sincronia com fatores ambientais como variação de fotoperíodo, temperatura e chuvas (Tyler & Sumpter, 1996; Mylonas *et al.*, 2010). Sendo assim, todo o controle endócrino deve ser alterado de alguma forma, quando espécies migradoras tem seu ciclo interrompido (Zaniboni-Filho & Weingart, 2007).

A interrupção do ciclo pode ser causada por: realocação da espécie para ambiente confinado, alterações no fluxo ou curso dos rios, barragens no percurso usado para migração, desta forma os peixes reofílicos (peixes de piracema) não conseguem eliminar os seus gametas de forma natural (Zaniboni-Filho & Weingart, 2007).

A reprodução artificial de espécies reofilicas só é possível mediante tratamentos hormonais, mas para cada espécie existem variações de número de doses, concentrações, tipos de hormônios, intervalos entre doses etc (Batlouni *et al.*, 2006, Zaniboni Filho *et al.*, 2006, Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012, Hainfellner *et al.*, 2012a, 2012b, Pereira, 2013), estes tratamentos tem por finalidade permitir a liberação dos gametas quando as matrizes estão maduras (Zaniboni-Filho & Weingart, 2007).

Desta forma, visando a possibilidade de uso da espécie para fins de produção, e também como forma de preservar seus estoques, o objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de indução para as matrizes selvagens de mapará, usando hormônio liberador de gonadotrofina ou extrato bruto de hipófise de carpa, com e sem uso de prostaglandina sintética, em diferentes concentrações. Estes hormônios já vêm sendo usados em diversas outras espécies (Dias *et al.*, 2012; Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012; Felizardo *et al.*, 2012; Hainfellner *et al.*, 2012a, 2012b; Honji *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2012; Pereira, 2013; Weber *et al.*, 2012; e outros), mas raramente para reproduzir espécies recém coletadas direto no ambiente natural. Além disso, um estudo do perfil hormonal e da resposta dos ovários de mapará, frente aos distintos tratamentos aplicados, foi desenvolvido com intuito de se conhecer melhor a biologia reprodutiva da espécie. Pretendemos com este estudo subsidiar a domesticação da espécie tentando estabelecer protocolos para produção de alevinos, bem como conhecer melhor a biologia reproductiva da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta

As desovas foram realizadas em ambiente natural na região do Baixo Rio Tocantins, à jusante da barragem de Tucuruí (S 3°49'55" W 49°39'9") que se localiza nas margens do município de Tucuruí (a cerca de 300 km ao sul de Belém), PA. O local foi escolhido pelo ciclo reprodutivo da espécie no local ser conhecido e por sabermos previamente da ocorrência de exemplares maduros neste local e data.

Coletas

Os peixes foram coletados com redes de espera (malhadeiras sem nós, malha 50mm, comprimento de 100m por 5m de altura) por pescadores profissionais da região. Pelo fato dos maparás necessitarem de natação constante, as redes eram constantemente verificadas e retiradas imediatamente da água quando eram observados movimentos bruscos das boias, os quais indicavam a presença de peixes.

Os peixes capturados e ainda vivos eram transportados em caixas de 80L preenchidas com água do rio e com 0,3% de NaCl. Em terra, os peixes eram realocados em caixas circulares de 500L, com oxigenação constante e sem obstáculos para natação. A água das caixas era renovada ininterruptamente por meio de bombas à gasolina ou bombas elétricas ligadas em inversor em bateria automotiva (12v). Essa estrutura foi montada na margem do rio para permitir o trabalho com os peixes recém-coletados. De posse dos peixes era feita uma seleção por meio de observação, onde peixes desorientados que não conseguiam nadar com o cardume eram retirados, pois acabavam colidindo com os saudáveis

resultando na morte de ambos. Definidos os grupos e os peixes aptos, foi possível começar com os testes de indução hormonal.

Foram feitas tentativas de indução nos períodos de 09 a 17/11/2012; 22 a 28/12/2012; 14 a 28/01/2013; 05 a 07/12/2013; 09 a 10/12/2013; 11 a 13/12/2013; 16 a 19/12/2013; 23 a 25/12/2013; 26 a 27/12/2013. Em cada período um grupo de no mínimo 5 peixes, sem indução, foi coletado para formar um grupo controle.

Todas as coletas foram feitas com prévia autorização concedida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através de autorização renovada anualmente pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (números: 27884-2; 27884-3; 27884-4; 27884-5).

Protocolo de indução hormonal

Uma vez que não existem dados sobre a desova, comportamento, estratégias e táticas reprodutivas da espécie inicialmente optamos pelo uso de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), substâncias mais comumente utilizadas para indução hormonal de peixes migradores tropicais (Dias *et al.*, 2012; Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012; Felizardo *et al.*, 2012; Hainfellner *et al.*, 2012a, 2012b; Honji *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2012; Pereira, 2013; Weber *et al.*, 2012; e outros).

Todos os peixes pré-selecionados eram pesados em dinamômetro para registro e cálculo das doses hormonais. Os protocolos utilizados estão apresentados nas tabelas II a VII. Diversos testes piloto, utilizados com a finalidade de testar a resistência da espécie, foram realizados, mas não foram apresentados. Os primeiros ensaios foram feitos aplicando protocolos tradicionais de EBHC (Experimentos 1 e 2) (Tabelas II e III), mas com a ausência de ovulação, modificamos as doses de EBHC e posteriormente incluímos o GnRH (Ovopel pellets com 20µg) (Experimento 3) (Tabela 3). Ainda sem ovulação bem sucedida, incluímos o uso de prostaglandina (Ciosin/Schering-Plough®) seguindo

a metodologia recentemente proposta por Criscuolo *et al.*, 2012 (Experimentos 3-6) (Tabela IV a VII). Não foi possível determinar antes da desova quais os peixes estavam maduros, pois não foi possível introduzir uma cânula nas fêmeas para obtenção de amostras de ovócitos, devido à sensibilidade da espécie. A classe de maturação só foi definida por meio de análises histológicas após o processo de indução hormonal. Além disso, as fêmeas, mesmo maduras, não apresentavam sinais claros como ventre abaulado e papila hemorrágica. Os machos não liberavam sêmen com pressão abdominal. Devido à fragilidade da espécie, o procedimento de injeção foi extremamente rápido, mantendo sempre os peixes dentro da água. Para isto, as doses, pré-preparadas, foram injetadas com os peixes nadando, de modo que uma pessoa aplicava a dose enquanto outra direcionava a natação do peixe. Após as doses, machos e fêmeas foram mantidos juntos em caixas de 500L (6 a 10 peixes por caixa, na proporção de 1:1).

Biometria e dissecação

Doze a 15h após a última dose hormonal as fêmeas induzidas foram separadas ao acaso e submetidas ao processo de extrusão manual de ovócitos. Apresentando ou não ovulação, os animais eram imediatamente anestesiados com dose benzocaína (0,1g/L). A massa total (Mt) e o comprimento total (Ct) foram aferidos respectivamente com um dinamômetro (com acurácia de 0,01g) e um ictiômetro (com acurácia de 0,1mm). Um grupo de fêmeas não injetadas foi também analisado e utilizado como grupo controle em cada experimento.

Após a biometria, amostras de sangue ($\pm 3\text{mL}$) foram imediatamente colhidas por punção de vasos caudais, utilizando seringas e agulhas descartáveis previamente lavadas com anticoagulante (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético(EDTA)). O sangue coletado foi transferido para micro tubos (3mL) e então centrifugado a 3000G por 10min, sendo o plasma aliquoteado em criotubos, os quais foram congelados e mantidos em nitrogênio líquido à -196°C até o momento de seu uso. Foram coletadas amostras de sangue e hipófise de todas as fêmeas induzidas e daquelas definidas como “grupo controle”.

Para coleta das hipófises, os instrumentos cirúrgicos foram pulverizados com spray Anti-RNase e luvas sem talco. Após a remoção da hipófise, esta foi imediatamente submergida e mantida em solução estabilizadora de RNA (Ácido Ribonucleico) (RNAlater® solution - Ambion® Inc., Applied Biosystems™, USA) por 24h a 4°C. Após este período, a solução contendo a hipófise foi estocada em nitrogênio líquido à -196°C até o momento de seu uso.

Após a coleta do sangue e hipófise, foi realizada uma incisão ventral a partir do orifício urogenital até a região da boca para a retirada dos ovários, fígado e vísceras, os quais foram pesados com dinamometro (acurácia de 0,01g). Com esses dados, foram calculados os seguintes índices corpóreos:

- Índice hepatossomático (IHS) = $[(\text{massa do fígado (g)} / \text{massa total (g)}) \times 100]$;
- Índice gonadossomático (IGS) = $[(\text{massa dos ovários (g)} / \text{massa total (g)}) \times 100]$;
- Índice viscerossomático (IVS) = $[(\text{massa das vísceras (g)} / \text{massa total (g)}) \times 100]$;

Toda metodologia adotada durante o desenvolvimento do presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp (Jaboticabal, SP, BR).

Análises histológicas e morfométricas dos ovários

Amostras das regiões cranial, média e caudal dos ovários foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, por 24h, e em seguida, lavadas em solução tampão fosfato (0,1M, pH 7,2) e submetidas ao processo de inclusão em historesina (Leica) para obtenção de cortes histológicos (com espessura de 2µm), os quais foram corados com Hematoxilina-Eosina.

Para determinar a frequência de volume ocupada pelos distintos tipos de ovócitos (pré-vitelogênicos, alvéolo-corticais, vitelogênicos, folículos pós-ovulatórios e atresícos), durante as coletas, foi utilizado um microscópio Olympus BX41 com sistema de captura Olympus DP11 capture (objetiva de 4x e ocular de 10x = 40x). Para cada peixe, foram utilizados 4 campos microscópicos, para cada

região dos ovários (cranial, média e caudal), ou seja, 12 campos microscópicos por ovário. As contagens foram feitas em um grid com 300 pontos (20x15), foram computados os pontos sobre as distintas estruturas mencionadas no parágrafo anterior e calculadas suas frequências (n° pontos * 100/total de pontos). O método utilizado para contagem foi o mesmo usado por Alvarenga & França (2009) com algumas modificações.

Para caracterização das classes de maturação ovariana foram utilizados os resultados obtidos com as análises morfométricas. Ovários que apresentavam predominantemente ovócitos pré-vitelogênicos (>90%) foram considerados como em “repouso/imaturos”; ovários preenchidos com ovócitos alvéolos corticais e vitelogênicos foram considerados como em “início de maturação”; ovários preenchidos com ovócitos vitelogênicos (>10%) foram considerados “maduros”; ovários com presença de folículos pós-ovulatórios e por ovócitos vitelogênicos foram considerados como “desovados”; ovários que apresentaram ovócitos atrésicos (>10%) foram definidos como “atrésicos”. Após a determinação dos estádios, foram determinados os percentuais médios de cada tipo ovocitário em cada estágio de maturação ovariana.

Análise dos esteróides gonadais

As análises dos hormônios esteroides 17β -estradiol (E2), 11-Cetotestosterona (11-KT), 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP) e 17α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (MIS) foram feitas utilizando kits comerciais (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA) de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), seguindo as instruções do fabricante. Para isso, o plasma armazenado em nitrogênio líquido à -196°C foi descongelado em temperatura de 5°C . Todas as amostras foram processadas em duplicatas e as validações dos kits foram determinadas calculando os coeficientes de variação (% CV) intra e inter-ensaios e pico de recuperação (%). O limite aceitável para o CV inter-ensaio foi $\leq 20,0\%$ e para o pico de recuperação, de 90 – 110 % (Sink *et al.*, 2008). As

medições de absorvância foram realizadas utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, CA, EUA).

Todo processo de análise de esteroides gonadais foi realizado sob supervisão da Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Nesta etapa, as hipófises foram descongeladas e passadas para microtubos contendo 500 μ L de Trizol onde foram maceradas com ajuda de agulhas descartáveis (1,60x40mm). Logo em seguida, mais 500 μ L de Trizol foram adicionados à mistura, a qual foi deixada incubando por 5min em temperatura ambiente. Após esta etapa, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, a mistura foi homogeneizada vigorosamente e deixada incubando por 3min à temperatura ambiente. Para separação da fase aquosa, que contém o RNA, as amostras foram então centrifugadas a 12000G por 15min em centrífuga refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, foi retirado a fase aquosa (superior) que foi armazenada em um microtubo limpo (RNase free), onde foi adicionado 500 μ L de isopropanol. O microtubo foi agitado por inversão, incubado por 10min em temperatura ambiente e centrifugado novamente a 12000G por 10min a 4°C. Após esta etapa, esvaziou-se os tubos (tomando o cuidado para que o pellet formado não se desprendesse), adicionou-se 1000 μ L de etanol 75% e homogenizou-se a solução até soltar o pellet. O material foi centrifugado novamente a 7500G por 5min a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o tubo com o pellet foi deixado aberto para secagem. O RNA obtido foi eluído em água MiliQ (RNase free) e quantificado espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Uniscience).

O DNA complementar (cDNA) foi obtido pelo método de transcrição reversa a partir de 2 μ g de RNA total que foi usado como fita molde utilizando o kit *Superscript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Todo o processo de extração de RNA e síntese de cDNA foi realizado no Laboratório de Biotecnologia (Laboratório de Reprodução de Peixes, do Centro de Aquicultura da UNESP – Campus de Jaboticabal).

PCR quantitativo em tempo real (RT –qPCR)

O cDNA obtido de cada amostra foi diluído para a concentração de 6ng/μL e analisado pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em placa optica de 96 poços (em duplicata) em um termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad), com auxílio de um analisador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System. Para a confecção dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes da fração beta do hormônio foliculo estimulante (*fshb*), da fração beta do hormônio luteinizante (*lhb*) e do fator de alongação1-alpha (*ef1a*) (gene normalizador) foram utilizadas sequencias de outras espécies de peixes encontradas no *The National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para tentar encontrar regiões conservadas para sequencias de interesse, utilizamos a ferramenta *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Para isso, foram utilizadas sequências já conhecidas de pelo menos 3 espécies de peixes para cada gene (Tabela I). Encontradas as regiões conservadas, foram selecionados senso e anti-sensos com aproximadamente 20 pares de bases e mantida a distância de 150-250 pares de bases entre eles (para manter um padrão de semelhança) (tabela VII). Os primers foram desenhados, a partir das regiões selecionadas, com auxílio da ferramenta

	<i>PCR</i>	<i>Primer</i>	<i>Stats</i>
--	------------	---------------	--------------

(http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html). Os resultados obtidos foram enviados para *Integrated DNA Technologies (IDT)* para confecção dos primers.

Para cada reação de RT–qPCR foram utilizados 15μL, constituídos de: 0,15μL com 200 nM de oligonucleotídeos de iniciação senso; 0,15μL com 200 nM de oligonucleotídeos de iniciação anti-senso; 5μL de amostra (concentração

6ng/ μ L); 7,5 μ L de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories); 2,2 μ L de UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen™).

As expressões dos genes *fshb* e *lhb* foram normalizadas pelo gene de referencia o *ef1a* e os cálculos de eficiência e expressão foram conduzidos seguindo a metodologia descrita por Bogerd *et al.* (2001).

Tanto o *desing* dos *primers* quanto PCR quantitativo em tempo real foram realizados sob supervisão do Prof. Wei Ge, na *Faculty of Health Sciences* na Universidade de Macau – China.

Características físicas e químicas da água nos locais de coleta

A água do local de coleta e das caixas onde foram mantidos os peixes, durante os testes hormonais, foram analisadas a cada coleta. As coletas de água sempre foram realizadas às 9h, em profundidade de 1,5 m. Foi utilizando um oxímetro HI 9146 – 10 (Hanna Instruments – Resolução: 0,01mg/L) para mensuração do oxigênio dissolvido; um medidor de pH HI 98172 (Hanna Instrument - Acurácia: \pm 0,1) para mensuração do pH; e um condutivímetro HI 98311 (Hanna Instruments – para condutividade acurácia de 0,1 μ S/cm e para temperatura acurácia de 0,15°C,) para mensuração da condutividade e temperatura. A transparência da água nos locais de coleta foi determinada com uso de disco de Secchi.

Análises estatísticas

Os resultados de cada variável foram comparados entre os animais induzidos e o “grupo controle”, e também ao longo das coletas entre si. Foi verificada a homocedasticidade e normalidade das variâncias, não sendo necessária a transformação dos dados.

Os dados foram então submetidos à análise de variância (ANOVA one-way), aplicou-se o teste F e sendo este significativo ($p < 0,05$), foi realizado o teste de Tukey a fim de diferenciar as médias à de 5% probabilidade. As análises dos dados foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS 8.2.

RESULTADOS

Na estação reprodutiva de dezembro de 2012 (Experimento 1) (Tabela II) e janeiro de 2013 (Experimento 2) (Tabela III), foi feito uso de uma e duas doses de EBHC respectivamente, mas nenhuma das 14 fêmeas injetadas ovulou (Tabelas II e III). Observamos pela análise dos ovários pós-desova que as fêmeas injetadas apresentavam-se maduras ou em repouso/imaturo ou em início de maturação (Tabela II e III). Observamos pela análise histológica dos ovários (pós-desova) que estes possuíam ovócitos vitelogênicos, mas não responderam ao tratamento hormonal (Figura 1A), pois não apresentaram quebra da vesícula germinativa (GVBD) e folículos pos-ovulatórios.

Na estação reprodutiva de dezembro de 2013 foi introduzido o GnRH que também não propiciou ovulação (Experimento 3) (Tabela IV). Em outro teste foi introduzido o uso de 0,5mL de prostaglandina sintética associada a uma dose de 2mg de EBHC/kg de peixe (Experimento 4)(Tabela V). Com este tratamento, 2 machos espermiaram com leve pressão abdominal, mas 10 fêmeas maduras não desovaram (Tabela V). Uma vez que as fêmeas não responderam ao tratamento anterior, a concentração de EBHC foi aumentada para 3mg /kg de peixe e 0,5mL prostaglandiuna, o que resultou na morte da maioria dos animais (Experimento 5) (Tabela VI).

Um novo tratamento de duas doses com 12h de intervalo (0,5mg de EBHC/kg de peixe + 3mg de EBHC/kg de peixe com 0,5mL prostaglandina) 50 peixes foram usados, 40 eram machos, 23 morreram após 1ª dose, 8 espermiaram. Das 10 fêmeas, 5 morreram após a 1ª dose e as outras 4

desovaram após 11-14h com leve pressão abdominal (Experimento 6) (Tabela VII)(Figura 1B).

As desovas obtidas das 4 fêmeas tiveram uma parte (0,3g) fixada em solução de glutaraldeído 2,5% para cálculos de fecundidade e análises histológicas, o restante foi fertilizado para tentativa de produção de larvas. Para execução desse procedimento o sêmen foi gotejado sobre os ovócitos sem que ocorresse contato com a água. Fertilizados, os ovos foram hidratados e colocados em incubadoras de fibra de vidro de 60L com fluxo contínuo de água, proveniente do próprio rio que foram coletadas as matrizes. Após 5h 100% dos ovos goraram e foram descartados.

As concentrações plasmáticas de E_2 não diferiram estatisticamente entre o grupo induzido e o grupo controle, com exceção de Dez/2012 ($P < 0,01$). Porém, neste período o grupo controle apresentou valores aproximadamente 5 vezes superiores aos controles das demais coletas. Ainda analisando os grupos controle, observamos variações significativas dos valores ao longo das coletas. Com relação aos animais avaliados pós-indução, os valores de E_2 foram similares ao longo das coletas (Figura 2A).

As concentrações plasmáticas de 11-KT em Nov/2012 foram maiores em animais induzidos, por outro lado, em Dez/2012 o grupo controle apresentou as maiores concentrações, nos outros períodos não houve diferença significativa (Figura 2B).

As concentrações plasmáticas de 17α -OHP em Jan/2013 não diferiram entre os animais induzidos e o controle, porém, em Dez/2013 os animais induzidos em apresentaram uma elevação de aproximadamente 6x quando comparados aos animais do grupo controle. No grupo controle também foi observado de Nov/2012 á Jan/2013 uma crescente elevação nas concentrações plasmáticas de 17α -OHP (Figura 3A).

As concentrações plasmáticas de MIS foram significativamente superiores nos animais induzidos em Dez/2012 e Dez/2013 em relação aos animais controle, além disso durante as coletas as concentrações de MIS em animais induzidos

foram sempre constantes quando comparado ao grupo controle que apresentou diminuição entre Nov/2012 e Jan/2013 (Figura 3B).

Com relação aos níveis da expressão dos genes, o *fshb* apresentou maior expressão nos animais induzidos ($0,810 \pm 0,207$) quando comparado aos animais não induzidos $0,530 \pm 0,028$ ($P < 0,05$) (média \pm erro padrão (EP)). Por outro lado, o *lhb* apresentou perfil inverso, pois os animais induzidos apresentaram menor expressão $0,460 \pm 0,046$ quando comparado aos animais não induzidos $0,764 \pm 0,085$ ($P < 0,05$) (média \pm erro padrão (EP)) (Figura 4).

Em dezembro de 2012 e janeiro de 2013 a água nas caixas onde os animais foram mantidos apresentou os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura de $30,5^{\circ}\text{C}$, condutividade de $47,4\mu\text{S}$, pH 7.0 e $5,7\text{mg/L}$ de oxigênio dissolvido. Em dezembro de 2013 os parâmetros foram: temperatura de $29,5^{\circ}\text{C}$, condutividade de $41,0\mu\text{S}$, pH 6,7 e $5,5\text{mg/L}$ de oxigênio dissolvido.

DISCUSSÃO

Na estação reprodutiva de dezembro de 2012 e janeiro de 2013 não se obteve sucesso com uso de EBHC na tentativa de desova do *H. marginatus*. O EBHC é o hormônio mais utilizado para a indução hormonal em peixes migradores nativos, no entanto, nem sempre promove a ovulação em todas as fêmeas injetadas de um plantel (Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012) e pode apresentar inúmeras falhas como induzir apenas a maturação final, mas não a ovulação e os ovócitos ficam retidos e não são liberados (Hainfellner *et al.*, 2012a).

Este resultado também pode estar associado ao protocolo utilizado em Dez/2012 (principal época de desova), onde por estratégia, optamos por evitar ao máximo o manejo e testar um protocolo de dose única 5mg/kg de peixe. Os protocolos de dose única se revelam eficazes em outros Siluriformes como o *Pseudopimelodus charus* e *Rhandia quelen*, onde a aplicação de dose única de 6mg EBHC/kg de peixe resultou em 75-80% de fêmeas ($n=15-20$) desovadas respectivamente (Vieira Sampaio & Sato, 2006). Porém, na maioria das outras

espécies, a dose única pode provocar a migração da vesícula germinativa para a periferia do ovócito, mas não a sua quebra (Levavi-Zermonsky & Yaron, 1986). A primeira dose ou dose preparatória pode iniciar a migração da vesícula germinativa e estimular a produção de receptores de hormônios gonadotróficos nas células foliculares, para então depois com a segunda dose romper a vesícula germinativa e por fim provocar a ovulação (Levavi-Zermonsky & Yaron, 1986). Este último padrão fisiológico descrito é possivelmente o mesmo que o mapará apresenta.

Por esta razão, em Jan/2013, optamos pelo protocolo com duas doses de EBHC (0,5-6,0mg/kg de peixe) com intervalo de 12h, mas resultados satisfatórios não foram obtidos. Sabe-se que, mesmo quando mantidos em cativeiro, os peixes migradores nativos apresentam falhas quando são submetidos à indução hormonal (Zohar & Mylonas, 2001) e a disfunção mais comum é a falha no processo de ovulação (Bobe & Labbé, 2010; Mylonas *et al.*, 2010). Recentemente, demonstramos que nem todas as fêmeas do matrinxã, *Brycon cephalus*, injetados com EBHC, atingem a ovulação (Hainfellner *et al.*, 2012a). De acordo com Zohar & Mylonas (2001), existem 3 tipos mais comuns de problemas encontrados em fêmeas submetidas à indução hormonal: a) o peixe pode falhar completamente e não apresentar vitelogênese; b) a vitelogênese pode progredir normalmente, mas os ovócitos vitelogênicos completos falham em passar pelo processo de maturação final, ovulação e desova; e c) os ovócitos sofrem vitelogênese normal, a maturação final e ovulação, mas os ovócitos ovulados não são liberados na água. Assim, as falhas observadas no mapará, devido à escassez de informações sobre a espécie, são difíceis de serem interpretadas. Se por um lado os esteroides gonadais se elevam com a indução hormonal (padrão indicativo de sucesso), por outro, morfológicamente os ovários pós-desova não se alteraram, como seria esperado (com maturação final e ovulação). Assim, além da elevada sensibilidade ao manejo, a espécie parece apresentar particularidades reprodutivas.

Com relação aos eventos morfológicos ovarianos esperados em fêmeas analisadas pós-indução hormonal devemos destacar o fenômeno de fácil

reconhecimento que é a maturação final, a qual envolve a retomada da meiose e é um pré-requisito para a ovulação. Esta fase ocorre normalmente durante as primeiras horas após a indução hormonal e é caracterizada por uma leve hidratação dos ovócitos e por um processo conhecido como quebra da vesícula germinativa (Nagahama & Yamashita, 2008). Assim, mesmo quando ocorrem falhas no processo de desova é possível identificar nos ovários pós-desova ovócitos que sofreram maturação final e apresentam vesícula germinativa rompida (Hainfellner *et al.*, 2012a e Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012). No entanto, este fenômeno foi raramente observado nos ovários de mapará analisados pós indução hormonal, sendo descrito apenas no tratamento de 0,5mg e 3mg de EBHC/kg com intervalo de 12h e aplicação de 0,5mL de prostaglandina. Assim, é possível que mesmo com elevações nas substâncias indutoras de maturação final observadas neste estudo (MIS), estas não encontraram receptores para mediar seus efeitos, ou não produziram os efeitos esperados por algum outro mecanismo por nós não identificado.

Nos experimentos realizados em dezembro de 2013, observamos que doses únicas com concentrações acima de 3mg de EBHC ou 1 Ovopel (GnRH) ou ainda o uso de mais de 1ml de prostaglandina por quilograma de peixe poderiam causar a morte dos *H. marginatus*. O uso de GnRH (Ovopel) também não apresentou resultados satisfatórios. A obtenção de ovócitos por extrusão foi obtida com doses de 0,5mg e 3mg de EBHC/kg com intervalo de 12h e aplicação de 0,5mL de prostaglandina sintética no momento da segunda dose, resultando em quatro desovas inéditas. O uso de prostaglandina é possivelmente um auxiliador da ovulação no *H. marginatus*, assim como é no *Piaractus mesopotamicus* (Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012).

Durante a indução hormonal, quando o processo de maturação final é concluído, a ovulação é iniciada e os ovócitos são liberados dos folículos, esse processo inclui a ruptura das conexões entre os microvilos dos ovócitos com os microvilos das células da camada granulosa, concomitante há um encurtamento e rompimento da parede do folículo e contração das células musculares lisas da parede folicular (Goetz, 1983). Esse processo foi observado no protocolo com

doses de 0,5mg e 3mg de EBHC/kg com intervalo de 12h e aplicação de 0,5mL de prostaglandina sintética no momento da segunda dose, confirmado pela histologia dos ovários.

Contudo, mesmo se tratando de eventos interligados, não são regidos exatamente pelas mesmas vias e fatores, pois, a maturação final dos ovócitos é regulada por ações não genômicas de hormônios indutores (MIS), enquanto que a ovulação é regulada por mecanismos genômicos (Theofan & Goetz 1981; Pinter & Thomas 1999). Em peixes podem ocorrer dois tipos de MIS: o 17α - 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) e o $17,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-one (20β -S). O DHP é o mais comum nos teleósteos estudados (Nagahama & Yamashita, 2008) e se origina pela conversão da 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP) pela enzima 20β - hidroxisteróide desidrogenase (20β -HSD) nas células granulosas (Nagahama & Yamashita, 2008), a elevação de MIS em todos animais induzidos reflete uma possível resposta dos tratamentos mas não necessariamente resultou na desova, no experimento 6 (Dez/2013) foi observado a maior diferença na concentração plasmática de MIS comparado ao grupo controle, podendo estar associado ao sucesso na obtenção da desova.

A atividade da 20β -HSD é controlada pelo hormônio luteinizante (Lh) (Suzuki *et al.*, 1988; Nagahama, 1997). Assim, em protocolos rotineiros de indução hormonal com EBHC considera-se que o Lh existente no extrato é o responsável pela indução dos processos de maturação final e ovulação (Aizen *et al.*, 2012). Fêmeas de piaçu, *Leporinus macrocephalus*, (Pereira, 2013) injetadas com EBHC e fêmeas de curimatá, *Prochilodus lineatus*, (Hainfellner *et al.*, 2012b) na época de reprodução apresentaram elevações significativas de 17α -OHP assim como o observado em dezembro de 2013, sendo os níveis desta substância um parâmetro importante para avaliar a estimulação exercida pelo EBHC e GnRH.

Não obstante, neste estudo, as reduções nas concentrações de E_2 pós-indução hormonal corroboram os resultados observados em carpas induzidas com uma ou duas doses de EBHC (Levavi-Zermonsky & Yaron, 1986). De acordo com estes autores, reduções de E_2 em animais pós indução hormonal se

associam com uma desova bem sucedida. A redução de E₂ e elevação do MIS durante a indução hormonal foram observadas no mapará, no entanto, muitas vezes sem serem acompanhadas por ovulação bem sucedida.

Da mesma maneira, ao analisarmos os níveis de gonadotrofinas, normalmente os níveis de FSH estão relacionados ao período de vitelogênese, acompanhado das elevações de E₂ e 11-KT (Nagahama, 1994), já a elevação dos níveis de LH podem estar relacionados ao final da vitelogênese e maturação final (Young *et al.*, 2005). Nos maparás induzidos (12 horas após 2^adose de EBHC) foi observado um pico de expressão de *fshb* acompanhado de uma redução de *lhb*. Essa elevação de *fshb* pós-desova é incomum em peixes de desova total como *Oncorhynchus mykiss* (Gomez *et al.*, 1999), mas por outro lado é observada em peixes de desova parcelada, como *Oreochromis niloticus* (Aizen *et al.*, 2007), *Scomber japonicus* (Nyuji *et al.*, 2012). Após a desova, elevações na expressão de *fshb* (pode indicar síntese de FSH) podem permitir que a vitelogênese ocorra em paralelo, fazendo com que os ovócitos vitelogênicos remanescentes no ovário entrem em maturação (Nyuji *et al.*, 2012). Essa informação corrobora com a possibilidade do mapará poder realizar desovas parceladas em dezembro. Este aspecto é não usual para o padrão de ciclo reprodutivo apresentado pela espécie, pois espécies de desova parcelada apresentam principalmente longas estação de desova, mas não apresentam longos períodos de repouso. Assim, esta pode ser mais uma particularidade reprodutiva da espécie, o que implicaria em novas estratégias de indução hormonal específicas para peixes de desova parcelada.

Ainda neste contexto, para peixes de desova parcelada, o procedimento mais indicado para indução hormonal, é o uso de implantes de liberação lenta de hormônios (Mylonas *et al.*, 1992; 1995; 1998; Fornies *et al.*, 2001; Mañanós *et al.*, 2002; Marino *et al.*, 2003). A maior parte dos resultados foi obtida com espécies de peixes de desova parcelada que desovam naturalmente em cativeiro, onde o uso de implantes pode incrementar o número de desovas por fêmeas, bem como as respectivas taxas de fecundidade (Mylonas *et al.*, 1998; 2003). Apesar do razoável conhecimento atual sobre o uso de implantes em fêmeas de

peixes, absolutamente nada se sabe sobre o uso destes em peixes tropicais sul-americanos de desova total. No entanto, no caso do *H. marginatus*, uma solução poderia ser aplicar doses hormonais menos concentradas e com o uso de um sistema semi-natural, as matrizes poderiam ser deixadas por alguns dias em caixas com renovação de água continua onde o efluente das caixas seria ligado a incubadoras para coleta dos ovócitos fecundados.

Com relação aos protocolos aplicados, como havia sido citado anteriormente, a espécie é muito sensível, portanto é possível que nem todas as mortes foram causadas pelos tratamentos hormonais. Durante o estudo eventualmente os pescadores capturavam cardumes de mais de 30 peixes, o tempo de retirada dos animais da rede de malha e a densidade durante o transporte até nós, pode ter acarretado na mortalidade de alguns tratamentos. Assim, mesmo selecionando os melhores animais (vigor) o manejo e o tratamento acabaram debilitando muito os indivíduos.

Em Dez/2013 mais de 130 animais injetados com variações de hormônios, número de doses, intervalo de doses, associação hormonal e em diferentes concentrações. Os dados obtidos indicam que o uso de EBHC em baixas concentrações 0,5mg e 3mg de EBHC/kg com intervalo de 12h e associação de 0,5mL de prostaglandina foi o mais eficaz para a espécie.

Assim, os resultados deste estudo revelam que as elevações nos níveis plasmáticos de 17α -OHP e MIS estão diretamente associados ao sucesso e resposta ao tratamento hormonaal. Mesmo assim, ainda existem muitas dúvidas com relação a elevação da expressão gênica de *fshb* e redução de *lhb* nos animais induzidos, sobre tudo, existem muitas espécies de peixes e ainda pouco se sabe sobre suas estratégias reprodutivas e ou por que da diminuição de seus estoques naturais.

Por ser uma espécie com ciclo reprodutivo similar a peixes de desova total, o mapará apresentou resultados inesperados frente aos tratamentos hormonais aplicadas. As falhas nos processos de indução hormonal observadas são conhecidas e descritas na literatura, no entanto, um padrão de resposta morfológicas habitual não foi encontrado nos ovários pós-indução hormonal de

maparás. Por outro lado o padrão de respostas de genes e hormônios envolvidos com este processo se assemelha ao de outras espécies que apresentam desova parcelada. Assim, apesar de termos obtido resultados positivos com um dos protocolos utilizados, mais estudos são necessários para se conhecer a biologia reprodutiva da espécie, não só para fins de produção aquícola, como também para preservar seus estoques naturais em franco declínio.

REFERÊNCIAS

- Agostinho ÂA, Thomaz SM, Gomes LC. 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, 1:1, 70-78.
- Aizen J, Kasuto H, Levavi-Sivan B. 2007. Development of specific enzyme-linked immunosorbent assay for determining LH and FSH levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. *General and comparative endocrinology*, 153:1, 323-332.
- Aizen JM, Kobayashi I, Selicharova YC, Sohn G, Yoshizaki, Levavi-Sivan B. 2012. Steroidogenic response of carp ovaries to piscine FSH and LH depends on the reproductive phase. *General and Comparative Endocrinology*, 178: 28-36.
- Alho CJ, Reis RE, Aquino PP. 2015. Amazonian freshwater habitats experiencing environmental and socioeconomic threats affecting subsistence fisheries. *Ambio*, 1-14.
- Alvarenga ER, França LR. 2009. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually matura Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Biology of Reproduction*, 80:537-544.
- Batlouni SR, Romagosa E, Borella MI. 2006. The reproductive cycle of male catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science*, 96: 116-132.
- Bobe J & Labbé C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 535-548.
- Bogerd J, Blomenrohr M, Andersson E, van der Putten HH, Tensen CP, Vischer HF, Granneman JC, Janssen-Dommerholt C, Goos HJ, Schulz RW. 2001. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod*. 64: 1633-1643.

- Carvalho JL & Merona B. 1986. Estudos sobre dois peixes migratórios do baixo Tocantins, antes do fechamento da barragem do Tucuruí. *Amazoniana*, 4: 595-607.
- Castello L, McGrath DG, Hess LL, Coe MT, Lefebvre PA, Petry P, ... Arantes CC. 2013. The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. *Conservation Letters*, 6:4, 217-229.
- Cintra IHA, Juras AA, Andrade JAC, Ogawa M. 2007. Caracterização dos desembarques pesqueiros na área de influência da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Estado do Pará, Brasil. *Boletim Técnico-Científico do CEPNOR*, 7: 135-152.
- Criscuolo-Urbinati ER, Kuradomi Y, Urbinati EC, Batlouni SR. 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology*, 78: 2087 – 2094.
- Cutrim L & Batista VS. 2005. Determinação de idade e crescimento do mapará (*Hypophthalmus marginatus*) na Amazônia Central. *Acta Amazônica*, 35: 85 – 92.
- Dias DC, Leonardo AFG, Tachibana L, Correa CF, Bordon ICAC, Romagosa E, Ranzani – Paiva MJT. 2012. Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28: 40 – 45.
- Felizardo VO, Murgas LDS, Andrade ES, López PA, Freitas RTF, Ferreira MR. 2012. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Theriogenology*, 77: 1570-1574.
- Fornies MA, Mananos E, Carrillo M, Laureau S, Mylonas CC, Zohar Y, Zanuy S. 2001. Effectiveness of different GnRHa-delivery systems on spawning induction in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 202: 221-234.
- Godinho AL, Kynard B, Godinho HP. 2007. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environ. Biol. Fish.*: 80: 421-433.

- Goetz FW & Cetta F. 1983. Ovarian and plasma PGE and PGF levels in naturally ovulating brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the effects of indomethacin on prostaglandin levels. *Prostaglandins*, 26: 387-95.
- Gomez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail PY, Breton B, Le Gac F. 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 113:413–428.
- Gonçalves C & Baptista VS. 2008. Avaliação do desembarque pesqueiro efetuado em Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, 38: 135-144.
- Gunkel G, Lange U, Walde D, Rosa JW. 2003. The environmental and operational impacts of Curuá-Una, a reservoir in the Amazon region of Pará, Brazil. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 8:3-4, 201-216.
- Hainfellner P, Munõz ME, de Souza TG, Freitas GA, Batlouni SR. 2012a. Spawning failure in *Brycon amazonicus* may be associated with ovulation and not with final oocyte maturation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64: 515- 517.
- Hainfellner P, de Souza T, Moreira RG, Nakaghi LSO, Batlouni SR. 2012b. Low estradiol levels, delayed vitellogenesis and reduced amounts of yolk are dysfunctions associated with the formation of low quality oocytes in *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, 10: 601-612.
- Honji RM, Tolussi CE, Mello PH, Caneppele D, Moreira RG. 2012. Embryonic development and larval stages of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) - implications for the conservation and rearing of this endangered Neotropical species. *Neotropical Ichthyology*, 10: 313 – 327.
- Levavi-Zermonsky B & Yaron Z. 1986. Changes in gonadotropin and ovarian steroids associated with oocytes maturation during spawning induction in the carp. *General and comparative endocrinology*, 62:1, 89-98.
- Manánós E, Carrillo M, Sorbera LA, Mylonas CC, Asturiano JF, Bayarri MJ, Zohar Y, Zanuy S. 2002. Luteinizing hormone (LH) and sexual steroid

plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa). *Journal of Fish Biology*, 328: 328-339.

Marino G, Panini E, Longobardi A, Mandich A, Finoia MG, Zohar Y, Mylonas CC. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture*, 219: 841-858.

Mérona B, Juras AA, Santos GM, Cintra IHA. 2010. Os peixes e a pesca no baixo rio Tocantins: 20 anos depois da UHE Tucuruí. 208p. Eletrobrás Eletronorte, Belém. 256p.

Mylonas CC, Hinshaw J M, Sullivan CV. 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture*, 106: 379-392.

Mylonas CC, Tabata Y, Langer R, Zohar Y. 1995. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *Journal of Controlled Release*, 35: 23-34.

Mylonas CC, Woods LC, Thomas P, Zohar Y. 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during post-vitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *General and Comparative Endocrinology*, 110: 276-289.

Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 516-534.

Mylonas CC, Sigelaki I, Divanach P, Maanos E, Zanuy S, Afonso-Polyviou. 2003. A. Multiple spawning of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after repeated injections of GnRHa, and evaluation of egg quality. *Aquaculture*, 221: 605-620.

Nagahama Y & Yamashita M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Differentiation*, 50: 195–219.

- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis International Journal of Developmental Biology. 38. p.217-229.
- Nagahama Y. 1997. 17 α ,20B, dihydroxy-4-pregnen-3-one maturation inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. Steroids, 62: 190- 196p.
- Nogueira LB, Azevedo PG, Canelhas MR, Bedore AG, Lopes JM, Godinho HP. 2012. Induced spawning and early ontogeny in hatchery-reared catfish *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropical Ichthyology, 10: 89 – 98.
- Nyuji M, Selvaraj S, Kitano H, Ohga H, Yoneda M, Shimizu A, ..., Matsuyama M. 2012. Changes in the expression of pituitary gonadotropin subunits during reproductive cycle of multiple spawning female chub mackerel *Scomber japonicus*. Fish physiology and biochemistry, 38:3, 883-897.
- Pereira TSB. 2013. Efeito de diferentes indutores hormonais sobre o processo de maturação final e ovulação em *Leporinus macrocephalus*. tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal. 45p.
- Pinter J & Thomas P. 1999. Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17,20beta,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. General and Comparative Endocrinology, 115: 200-209.
- Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA. 2008. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. Fish Physiology and Biochemistry, 34: 95-101.
- Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y. 1988. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. General and Comparative Endocrinology, 71: 292–301.
- Theofan G & Goetz FW. 1981. The in vitro effects of transcriptional and translational protein synthesis inhibitors on final maturation and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes; Comparative Biochemistry and Physiology A, 69: 557-561.

- Tolmasquim MT. 2012. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. *Estudos Avançados*, 26:74, 247-260.
- Tyler CR & Sumpter JP. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 287–318.
- Vieira Sampaio E & Sato Y. 2006. Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 28: 263-268.
- Weber AA, Sato Y, Santos JE, Rizzo E, Bazzoli N. 2012. Eggs ultrastructure and early development of *Franciscodoras marmoratus* (Pisces: Doradidae). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 41: 177 – 183.
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen A, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B. 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 137: 447-277.
- Young G, Kusakabe M, Nakamura I, Lokman PM, Goetz FW. 2005. Gonadal Steroidogenesis in Teleost Fish. In: *Hormones and their Receptors in Fish Reproduction*. Melamed, P., Sherwood, N., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltda. 1° ed. Singapore, p.155-223.
- Zaniboni Filho E, Reynalte-Tataje D, Weingartner M. 2006. Potencialidad del género Brycon en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19: 233-240.
- Zaniboni Filho E & Weingartner M. 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31: 367-373.
- Zohar Y, Mylonas CC. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136.

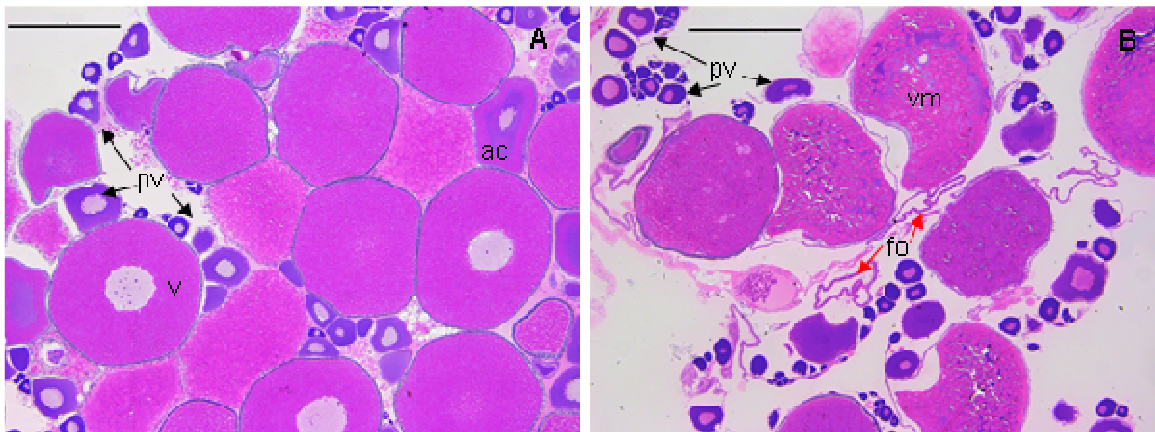


Figura 1. Secções transversais de ovários maduros de *Hypophthalmus marginatus*. (A) Fêmea 241, que não respondeu ao tratamento hormonal (B) Fêmea 246, que respondeu ao tratamento hormonal; Legenda: (ac) Álveolo-cortical; (v) Vitelogênico; (vm) Vitelogênico com núcleo migrado; (pv) (seta preta)Pré-vitelogênico; (fo) (seta vermelha)Folículo Pós-ovulatório; Barra=500 μ m. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Espessura dos cortes: 2 μ m.

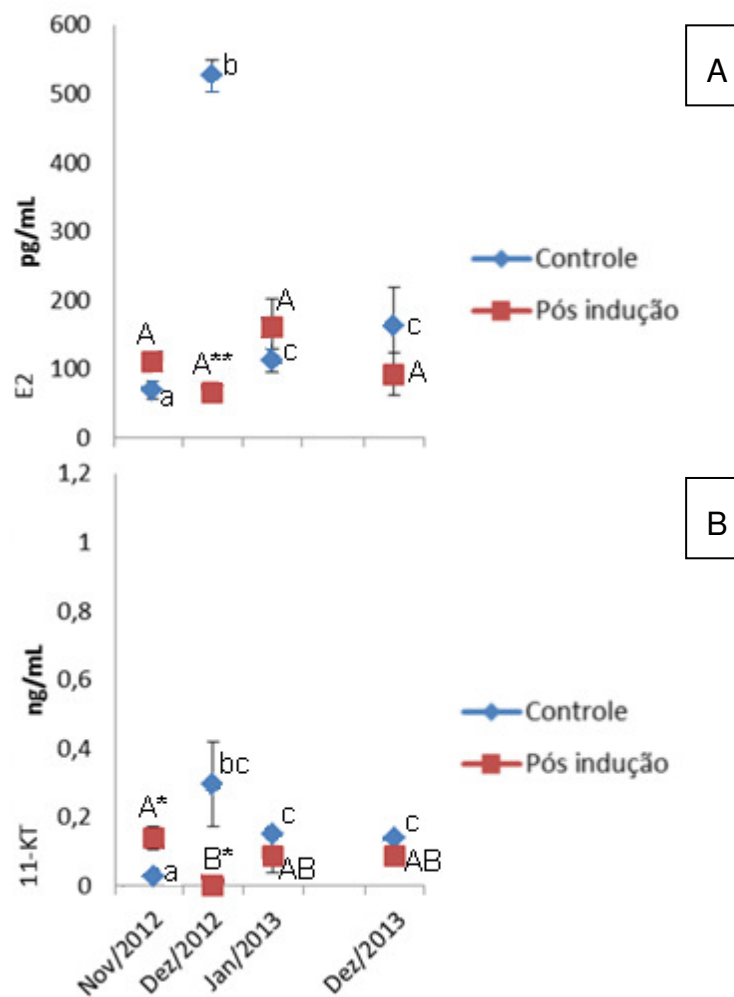


Figura 2. (A) Médias dos valores de concentração plasmática de E₂ (17 β -estradiol) e (B) 11-KT (11- Cetotestosterona). Controle (azul), representa animais não injetados, Pós indução (vermelho), animais induzidos que foram analisados 12-15h após 2^a dose. Barras representam erro padrão. Diferentes letras minúsculas e maiúsculas representam respectivamente diferenças entre as médias dentro do grupo controle e pós indução ao longo das coletas (teste de Tukey, P< 0,05). * indica diferença significativa (P<0,05) ou ** (P<0,01), entre o grupo induzido e o grupo controle na mesma coleta.

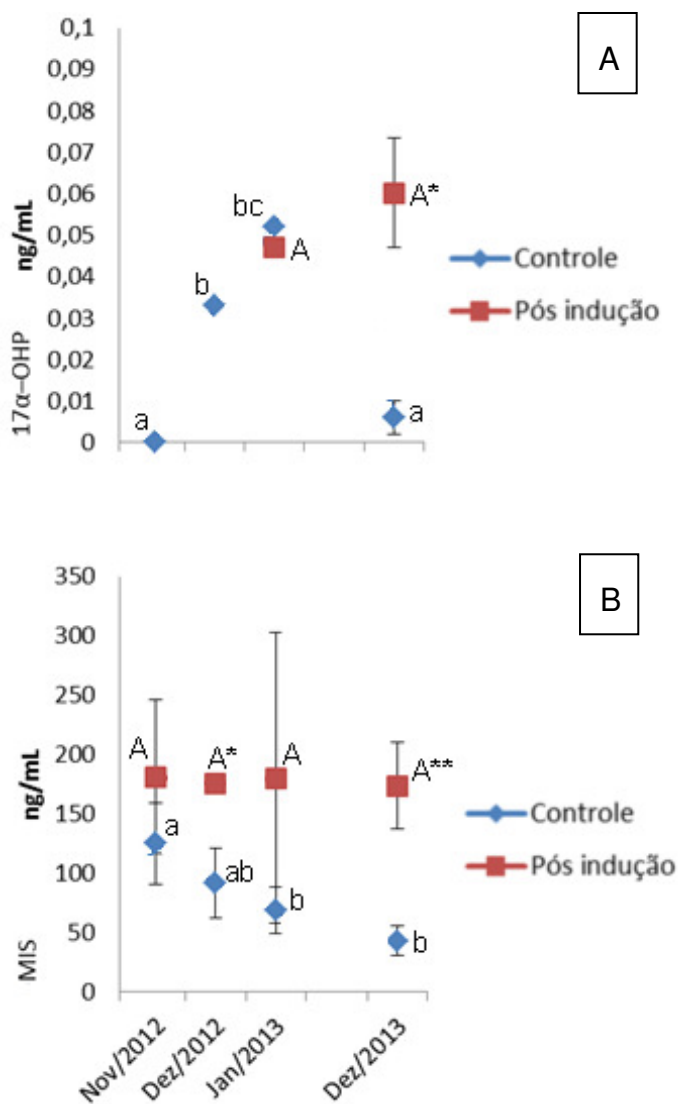


Figura 3. (A) Médias dos valores de concentração plasmática de 17α-OHP(17α-hidroxiprogesterona) e (B) MIS (17α - 20β-dihidroxi-4-pregnen-3-ona). Controle (azul), representa animais não injetados, Pós indução (vermelho), animais induzidos que foram analisados 12-15h após 2ª dose. Barras representam erro padrão. Diferentes letras minúsculas e maiúsculas representam respectivamente diferenças entre as médias dentro do grupo controle e pós indução ao longo das coletas (teste de Tukey, P< 0,05). * indica diferença significativa (P<0,05) ou ** (P<0,01), entre o grupo induzido e o grupo controle na mesma coleta.

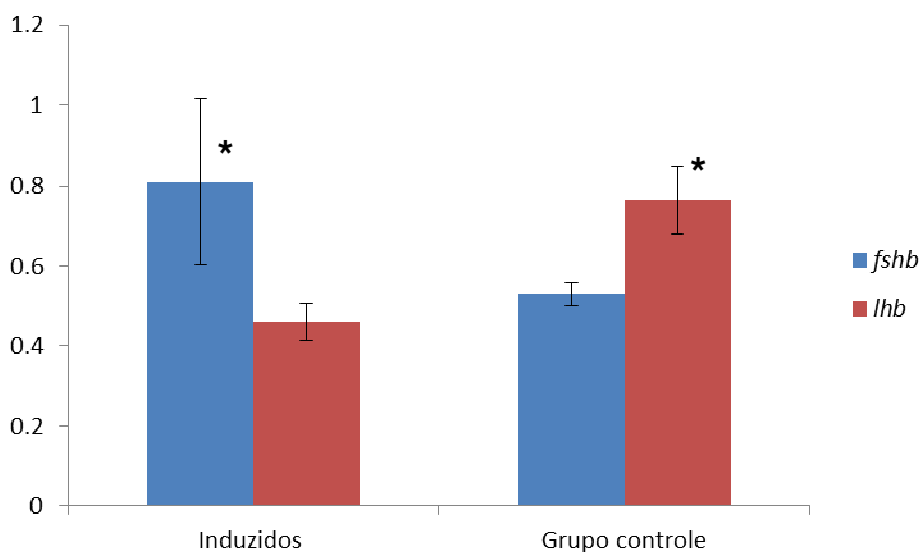


Figura 4. Níveis da expressão dos genes *fshb* e *lhb* nos animais Induzidos e no Grupo controle. * indica diferença significativa entre induzidos e Grupo controle ($P < 0,05$).

Tabela I. Oligonucleotídeos iniciadores para a expressão gênica (RT-qPCR) dos genes que codificam para o hormônio luteinizante subunidade beta (*lhb*), hormônio folículo estimulante subunidade beta (*fshb*) e fator de alongação 1 Alfa (*ef1a*).

Genes	Nº acesso	Espécies	senso	anti-senso
<i>fshb</i>	AF325218S1; KF998583; AY973947	<i>Clarias gariepinus</i> ; <i>Hemibagrus nemurus</i> ; <i>Silurus meridionalis</i> ;	GTGTTGCTGTTGCCGATGCT	TGAAGTTGCAGGTGTTCTGGA
<i>lhb</i>	AY973946; KF934190; EF194763; JF340465; AY424305;	<i>Silurus meridionalis</i> ; <i>Hemibagrus nemurus</i> ; <i>Ctenopharyngodon idella</i> ; <i>Gobiocypris rarus</i> ; <i>Danio rerio</i> ;	GGACACTGCTTCACCAAGGAACC	TGAGGTGTCCATGGTGACAGGCT
<i>ef1a</i>	AY264196; AY264198; AY264197; JF834099; JF834094;	<i>Hypophthalmus edentatus</i> ; <i>Zungaro zungaro</i> ; <i>Sorubim lima</i> ; <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> ; <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> ;	CTGTTGAAATGCACCACGAGTCTCT	CCTGAGCAGTGAAGCTGCCA

Tabela II. Experimento 1. Aplicação de dose única de 5,0mg de EBHC/kg de peixe (Nov.Dez/2012).

<i>Hypophtalmus marginatus</i>	Mt (g)	Resultado	Classe de Maturação
Fêmea 120	420	não desovou	repouso/imaturo
Fêmea 121	680	não desovou	repouso/imaturo
Fêmea 134	500	não desovou	maturação
Fêmea 135	440	não desovou	maturação

Tabela III. Experimento 2. Aplicação de duas doses de 0,5mg e 6,0mg de EBHC/kg de peixe com intervalo de 12h entre doses (Jan/2013).

<i>Hypophtalmus marginatus</i>	Mt (g)	Resultado	Classe de Maturação
Fêmea 153	820	não desovou	maturação
Fêmea 158	850	não desovou	maturação
Fêmea 159	800	não desovou	repouso/imaturo
Fêmea 160	780	não desovou	maturação
Fêmea 165	960	não desovou	maturação

Tabela IV. Experimento 3. Aplicação de Ovipel em pellets contendo 20µg de GnRH (Gn) em associação de prostaglandina sintética (CS) (Dez/2013).

<i>Hypophtalmus marginatus</i>	Mt (g)	Dose Hormonal	Resultado	Classe de Maturação
Fêmea 230	490	1 Gn + 1ml CS	morreu	madura
Fêmea 232	770	1/3 Gn + 0,5ml CS	não desovou	repouso
Fêmea 233	460	1/3 Gn + 0,5ml CS	não desovou	repouso
Fêmea 234	527	1/3 Gn + 0,5ml CS	não desovou	regressão

Tabela V. Experimento 4. Aplicação de dose única de 2,0mg de EBHC/kg de peixe em associação de 0,5mL de prostaglandina sintética (Dez/2013).

<i>Hypophtalmus marginatus</i>	Mt (g)	Resultado	Classe de Maturação
Fêmea 235	500	não desovou	madura
Fêmea 236	426	não desovou	madura
Fêmea 237	503	não desovou	madura
Fêmea 240	495	não desovou	madura
Fêmea 241	510	não desovou	madura

Tabela VI. Experimento 5. Aplicação de dose única de 3,0mg de EBHC/kg de peixe em associação de 0,5mL de prostaglandina sintética (CS) (Dez/2013).

<i>Hypophtalmus marginatus</i>	Mt (g)	Resultado	Classe de Maturação
Fêmea 261	980	não desovou	inicio atresia
Fêmea 262	565	morreu 12h após dose	repouso
Fêmea 263	538	morreu 12h após dose	madura
Fêmea 264	545	morreu 12h após dose	madura
Fêmea 265	471	morreu 12h após dose	madura

Tabela VII. Experimento 6. Aplicação de duas doses de 0,5mg e 3,0mg de EBHC/kg de peixe com intervalo de 12h entre doses e associação de 0,5mL de prostaglandina sintética no momento da segunda dose (Dez/2013).

<i>Hypophtalmus marginatus</i>	Mt (g)	Resultado	Classe de Maturação
Fêmea 246	506	desovou após 11h	madura
Fêmea 247	510	morreu	madura
Fêmea 248	774	desovou após 11h	madura
Fêmea 250	432	morreu 4h após 2ª dose	inicio atresia
Fêmea 251	575	desovou após 14h	madura