

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

**Terapias hormonais aplicadas à reprodução
de *Astyanax altiparanae* (Characiformes:
Characidae) em cativeiro, fora da estação
reprodutiva.**

Gabriela Brambila de Souza

Jaboticabal, São Paulo
2018

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

**Terapias hormonais aplicadas à reprodução
de *Astyanax altiparanae* (Characiformes:
Characidae) em cativeiro, fora da estação
reprodutiva.**

Gabriela Brambila de Souza

Orientador: Renata Guimarães Moreira Whitton

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.

Jaboticabal, São Paulo
2018

S729t Souza, Gabriela Brambila de
Terapias hormonais aplicadas à reprodução de *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) em cativeiro, fora da estação reprodutiva. -- Jaboticabal, 2018
47 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2018
Orientadora: Renata Guimarães Moreira
Banca examinadora: Elizabeth Romagosa, Rosicleire Verissimo Silveira, Taís da Silva Lopes, Gisele Cristiane de Melo Dias
Bibliografia

1. GnRH. 2. Temperatura. 3. Desova induzida. 4. estradiol. 5. Gonadotropina. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 636.3.043

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Terapias hormonais aplicadas à reprodução de *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) em cativeiro, fora da estação reprodutiva

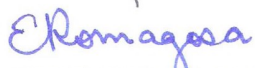
AUTORA: GABRIELA BRAMBILA DE SOUZA

ORIENTADORA: RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON

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



Profa. Dra. RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON
Departamento de Fisiologia / IB/USP, São Paulo-SP



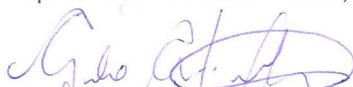
Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA
Centro de Pesquisa em Peixes Ornamentais / Instituto de Pesca, IP, São Paulo-SP



Profa. Dra. ROSICLEIRE VERÍSSIMO SILVEIRA
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/ FEIS - UNESP



Profa. Dra. TAÍS DA SILVA LOPES
Departamento de Aquicultura / Instituto Pesca, APTA, São Paulo-SP



Profa. Dra. GISELE CRISTJANE DE MELO DIAS
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo, São Paulo-SP

Jaboticabal, 13 de dezembro de 2018

Doutoranda:
Gabriela Brambila de Souza

Orientadora:
Renata Guimarães Moreira Whitton

Não estejais ansiosos quanto a vossa vida, pelo que haveis de comer ou pelo que haveis de beber, nem quanto ao vosso corpo, pelo que haveis de vestir. Não é a vida mais do que o alimento e corpo mais do que o vestuário?

Não vos inquieteis, pois, pelo dia de amanhã. Mas busque primeiro o reino de Deus e todas estas coisas vos serão acrescentadas.

*Jesus Cristo
Mateus 6. 25-33*

Dedico

A um grande amigo, a pessoa mais forte e guerreira que eu conheci que lutou bravamente pela vida ao longo destes quatro anos, mas que ao fim, no mês de novembro deste ano alcançou o descanso tão merecido.

Silas de Aquino Silva “in memoriam”

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVO	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Organismo/Local de estudo	10
3.2. Delineamento experimental	11
3.2.1. Experimento com injeções	12
3.2.2. Experimento com implantes	13
3.3. Procedimentos específicos	15
3.3.1. Manipulação dos animais	15
3.3.2. Análise de expressão gênica de vitelogenina e hormônios hipofisários (<i>fshβ</i> e <i>lhβ</i>)	16
3.3.3. Análises de esteroides	17
3.3.4. Análises morfológicas	18
3.3.5. Parâmetros reprodutivos	20
3.4. Análise de dados	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Experimento Injeção	21
4.1.1. Análises de expressão gênica de hormônios hipofisários (<i>fshβ</i> e <i>lhβ</i>) e vitelogenina	21
4.1.2. Análises de esteroides	22
4.1.3. Análises morfológicas	24
4.1.4. Parâmetros reprodutivos	26
4.2. Experimento com Implante de GnRH	27
4.2.1. Análise da expressão gênica de vitelogenina e hormônios hipofisários (<i>fshβ</i> e <i>lhβ</i>)	27
4.2.2. Análises de esteroides	28
4.2.3. Índice gonadossomático	30
4.2.4. Parâmetros reprodutivos	31
5. DISCUSSÃO	33
5.1. Experimento Injeção	33
5.2. Experimento Implante	35
5.3. Discussão geral	39
6. CONCLUSÃO	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Indução de fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* à gametogênese, ovulação e desova. Injeções de GnRH α em dose baixa (4 μ g/g) e altas (8 μ g/g), divididas em 3 doses semanais, em 20°C ou 27°C. No final do período, os peixes de cada condição experimental foram tratados com hCG ou solução salina (controle), para induzir à ovulação e desova. As fêmeas foram mantidas na mesma temperatura durante todo o período experimental (aclimação, período de gametogênese e indução à ovulação e desova). 13
- Figura 2: Indução de fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* à gametogênese, ovulação e desova. Implantes de GnRH α em dose baixa (4 μ g/g) e alta (8 μ g/g), em 20°C ou 28°C. No final do período, os peixes de cada condição experimental foram tratados com hCG ou solução salina (controle), para induzir à ovulação e desova. As fêmeas foram mantidas na mesma temperatura durante todo o período experimental (aclimação, período de gametogênese e indução à ovulação e desova). 14
- Figura 3: Expressão dos genes *fsH β* (A), *lh β* (B) e *vtgA* (C) em fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de injeções de GnRH α . 22
- Figura 4: Concentração plasmática de 17 β -estradiol (média \pm EPM) em fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de injeções de GnRH α . 23
- Figura 5: Concentração plasmática (média \pm EPM) de 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona em fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de injeção de GnRH α e induzidos à ovulação e desova com hCG. 24
- Figura 6: Diâmetro do oócito (A), Índice Gonadossomático (IGS) (B) e Fecundidade relativa (C) (média \pm EPM) em fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de injeções de GnRH α . 25
- Figura 7: Expressão dos genes *fsH β* (A), *lh β* (B) e *vtgA* (C) em fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias com implantes de GnRH α . 28
- Figura 8: Concentração plasmática de 17 β -estradiol (média \pm EPM) em fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias com 29

implantes de GnRHa.

Figura 9: Concentração plasmática de 17α - 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (média \pm EPM) em fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de implante de GnRHa e induzidos à ovulação e desova com hCG. 30

Figura 10: Índice Gonadossomático (IGS) (média \pm EPM) em fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias com implantes de GnRHa. 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do estágio de maturação do ovário de acordo com a fase do desenvolvimento oocitário em *A. altiparanae* expostos a manipulação termal e injeções de GnRHa. 26

Tabela 2: Parâmetros reprodutivos em fêmeas de *A. altiparanae* induzidas à ovulação e desova após 21 dias de injeções de GnRHa 27

Tabela 3: Parâmetros reprodutivos em fêmeas de *A. altiparanae* induzidas à ovulação e desova após 21 dias com implantes de GnRHa 32

AGRADECIMENTOS

De todas as partes complicadas que existe ao se executar e escrever uma tese, nenhuma delas é mais dolorosa, emocionante e eu diria até mais chorosa que os agradecimentos, e é nesse sentimento e com lágrimas nos olhos que inicio aqui meus mais profundos pedidos de obrigada, pois certamente sem as pessoas que irei citar eu não teria chegado aqui. MUITO OBRIGADA!

Primeiramente a Deus que permitiu que pessoas tão boas entrassem na minha vida, permitiu também que eu vivesse cada minuto desse doutorado da melhor maneira e que esteve comigo em todos eles em cada dificuldade, que foram muitas “rsrs”, me ajudando a vencer todas elas, mesmo muitas vezes sem o meu merecimento.

Logo em seguida à minha orientadora Professora Doutora Renata Guimarães Moreira Whitton por sua dedicação, parceria e exemplo de liderança. Obrigada por me ensinar tudo que eu sei e por confiar e acreditar em mim, mesmo e principalmente, quando nem eu mesma acreditei. Obrigada por ser essa profissional excelente que não perde em nada para amiga indispensável que você é. Ainda não sei qual será o rumo que minha vida vai tomar, mas tenho plena certeza, que se você permitir estará sempre rodeando a sua. Obrigada por ser essa pessoa tão generosa a quem eu aprendi a amar e me desculpe pelas vezes, que sei que deixei a desejar.

Ao meu parceiro de vida toda até aqui André Ochiulini Silva pela confiança depositada em mim e por muitas vezes abrir mão dos seus sonhos em prol dos meus, pelo amor e carinho dedicados a mim e principalmente pela paciência nos momentos difíceis e pelas palavras de encorajamento quando necessário. Obrigada por tudo que fez por mim, tenho plena certeza de que nossas vidas não se cruzaram por acaso.

Aos meus pais Edna e Adenirson e irmão Guilherme pelo suporte emocional e muitas vezes financeiro para concretização dos meus planos. Vocês representam a minha base, meu porto seguro. Muito obrigada! Espero poder retribuir toda essa dedicação, eu os amo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) nº 140428/2016-0, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nº 2014/16320-7 pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colaboradores Sergio Ricardo Batlouni, Rafael Yutaka Kuradomi, Paulo Henrique de Mello e Carlos Eduardo Tolussi por todo trabalho e dias dispensados a me ajudar.

Ao Dr. Constantinos Chrysanthos Mylonas pela elaboração dos implantes e principalmente pela parceria e colaboração com as análises e revisão textual.

Aos alunos do Laboratório de Reprodução do CAUNESP, Daniel Figueiredo, Guilherme A. Freitas, Laiza Silva, Mariana Roza de Abreu, Marina Calil e Rafael Sato por me receberem tão bem no laboratório e sempre estarem dispostos a me ajudar nas manipulações e coletas, além de claro me fazerem companhia nas noites de Jaboticabal. Foram momentos maravilhosos.

Aos técnicos do CAUNESP, Silvia, Luiz, Marcio e Valdecir por estarem sempre prontos a ajudar em qualquer emergência.

Às minhas amigas Roberta e Fernanda por abrirem sua casa mais de uma vez pra eu morar. Pelas risadas e momentos de descontração. Pelas festas e conversas até o raiar do dia. Obrigada por confiarem sua casa e sua vida a mim.

Aos meus amigos do LAMEROA (Aline Dal'Olio Gomes, Bianca Rangel, Bruno Cavalheiro Araujo, Bruno Tadeu Marotta Lima, Carlos Eduardo de Oliveira Garcia, Carlos Eduardo Tolussi, Cecilia Bertacini, Diego Brito, Ethiene Fernandes, Fernanda Mello, Filipe Godoi, Giovana Branco, João Paulo Silva Pinheiro, Joseane Silva, Kainã Fagundes, Marcela Penuela Muñoz, Maria Escalante Rojas, Natália Pires, Paulo de Mello, Raphaela Ribeiro, Renato Honji, Vagner Alberto, Victor Marques, Victoria Frachetta) com quem convivi a maior parte do meu doutorado e com certeza com quem mais aprendi. Obrigada por toda ajuda nos momentos que precisei, pois sem vocês nada disso teria a menor graça e com certeza seria muito mais difícil. Muito obrigada pelas risadas, descontrações, mas principalmente pelo apoio nas horas

Doutoranda:
Gabriela Brambila de Souza

Orientadora:
Renata Guimarães Moreira Whitton

difíceis. Cada um com seu jeito, uns mais amáveis outros mais brutos, uns sensatos e outros totalmente sem noção. Vocês certamente tem responsabilidade na minha formação. Aprendi a amar muitos de vocês e a respeitar as diferenças entre nós.

Terapias hormonais aplicadas à reprodução de *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) em cativeiro, fora da estação reprodutiva

RESUMO

O lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) na natureza, reproduz durante a primavera-verão, mas as fêmeas permanecem vitelogênicas ao longo de todo ano, incluindo o período de inverno, quando a desova não ocorre. O presente estudo investigou a influência da modulação da temperatura no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do lambari, fora da estação reprodutiva, bem como os efeitos de diferentes terapias com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH_a). Foram conduzidos dois experimentos, um com múltiplas injeções de GnRH_a e outro com implantes de GnRH_a, em duas doses e duas temperaturas da água, sendo uma correspondente ao inverno e outra ao verão. No final do período experimental, as fêmeas das condições experimentais diferentes foram induzidas a desovar utilizando gonadotrofina coriônica humana (hCG). A análise dos dois experimentos em conjunto, demonstra que independente da forma de administração, a suplementação de fêmeas de *A. altiparanae* com GnRH_a fora do período reprodutivo desencadeia alterações no eixo hipófise-gônadas, dependentes da temperatura de exposição, que aumenta a viabilidade na produção de larvas desta espécie. As injeções repetidas desencadearam uma resposta mais evidente na hipófise de animais em baixas temperaturas. Os dados dos índices de desempenho na reprodução induzida mostraram que a administração de GnRH_a na forma de injeções também foi mais eficiente na produção de larvas, quando mantidos em temperaturas mais elevadas, enquanto o GnRH_a na forma de implante resultou em maior produção estimada de larvas em temperaturas mais baixas.

Palavras chave: GnRH_a, temperatura, desova induzida, estradiol, gonadotropinas, vitelogenina.

Hormonal therapies applied to the reproduction of *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) in captivity, during the non-breeding season.

ABSTRACT

The *lambari-do-rabo-amarelo* (*Astyanax altiparanae*) in the wild reproduce during spring and summer, but females remain vitellogenic throughout the year, including the winter period, when spawning does not occur. The present study investigated the influence of temperature modulation on the hypothalamic-pituitary-gonad axis of the lambari in non-breeding season, as well as the effects of different therapies with gonadotropin releasing hormone analog (GnRHa). Two experiments were conducted, one with multiple injections of GnRHa and the other with GnRHa implants, in two doses and two water temperatures, one corresponding to winter and another of summer. At the end of the experimental period, females from different experimental conditions were induced to spawn using human chorionic gonadotrophin (hCG). The analysis of the two experiments shows that regardless of the administration form, the supplementation of GnRHa in *A. altiparanae* females, in non-breeding period, triggers alterations in the pituitary-gonadal axis, depending on the exposure temperature, increasing the viability in the production of larvae of this species. Repeated injections elicited a more evident response in the pituitary gland at low temperatures. The performance data on induced reproduction showed that the administration of GnRHa in the form of injections was more efficient in larvae production, when kept at higher temperatures, while GnRHa implants resulted in higher estimated larval production at lower temperatures.

Key words: GnRHa, temperature, induced spawning, estradiol, gonadotropins, vitellogenin.

1. INTRODUÇÃO

Teleósteos migradores, quando mantidos em cativeiro, apresentam dificuldades em completar o ciclo reprodutivo, principalmente nas fases de maturação final e desova (Agostinho *et al.*, 2007a,b; Miranda e Ribeiro, 1997; Resende *et al.*, 1995). A migração é necessária para o desenvolvimento dos ovários e testículos, assim como a maturação dos gametas e desova, e o bloqueio da migração se torna um importante obstáculo à reprodução destas espécies (Agostinho *et al.*, 2007a). Zohar e Mylonas (2001) sugerem três diferentes tipos de disfunções reprodutivas em fêmeas de teleósteos, quando mantidas em cativeiro. No primeiro caso há falha completa da vitelogênese, como por exemplo, em algumas espécies de enguias; a segunda, e mais comum disfunção reprodutiva, é a ausência de maturação final dos oócitos, com a vitelogênese progredindo normalmente, mas a quebra da vesícula germinativa e a ovulação não ocorrem, como em algumas espécies potamódromas; e o terceiro e último caso, ocorre quando as fêmeas avançam até as fases de maturação final e ovulação, mas a desova não se concretiza como ocorre em trutas. Nestes últimos casos, os oócitos normalmente são reabsorvidos caso não sejam artificialmente extrusados.

Como mencionado, a maioria das espécies de teleósteos tropicais potamódromos (que fazem migração em água doce) cultivadas no Brasil se enquadra no segundo tipo de disfunção descrita por Zohar e Mylonas (2001). Desta forma, para dar continuidade à produção comercial destas espécies há a necessidade da indução hormonal para a efetivação da reprodução em cativeiro (Agostinho *et al.*, 2007b). Esse processo de indução hormonal corresponde à suplementação de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, com o uso de hormônios sintéticos ou extratos hipofisários de peixes doadores (Harvey e Carolsfeld, 1993; Honji *et al.*, 2011). No entanto, esse processo, na maioria das vezes, só é efetivo quando os animais são manejados dentro do período reprodutivo, que se dá entre a primavera e o verão para a maioria das espécies migradoras tropicais (Caneppele *et al.*, 2009; Hainfellner *et al.*, 2012; Honji *et al.*, 2009).

Espécies de clima temperado e elevadas latitudes, em sua maioria, têm sua reprodução ocorrendo quando as temperaturas e comprimento dos dias estão aumentando, ou seja, na primavera, enquanto que nos peixes tropicais e subtropicais o período reprodutivo parece estar relacionado com o aumento da pluviosidade e temperatura da água ou ainda movimentos sazonais nas correntes oceânicas (Bromage *et al.*, 2001). O processo de maturação gonadal envolve um período no qual os oócitos se preparam para ovulação, então fica claro que este processo é dependente de alguns sinais sincronizadores ambientais anteriores às mudanças mencionadas nas características da água (Bromage *et al.*, 2001).

A reprodução em teleósteos como já dito é modulada por estímulos ambientais externos (temperatura da água, fotoperíodo, pluviometria, dentre os principais), e endogenamente é controlada pelo sistema neuroendócrino, mediado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (H-H-G) (Migaud *et al.*, 2010). Os estímulos ambientais captados por receptores sensoriais são transduzidos pelo sistema nervoso e estimulam neurônios hipotalâmicos a sintetizar e liberar um neuro-hormônio chamado Hormônio Liberador das Gonadotropinas (GnRH), que por sua vez estimula as células gonadotrópicas localizadas na adeno-hipófise, a sintetizar e liberar as gonadotropinas, chamadas de Hormônio Folículo-Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH). Outros neuro-hormônios importantes na modulação das células gonadotrópicas hipofisárias são o Hormônio Inibidor de Gonadotropinas (GnIH), a dopamina, que inibem a síntese e a liberação das gonadotropinas hipofisárias e do próprio GnRH (Tsutsui *et al.*, 2000; Tsutsui *et al.*, 2012; Zohar *et al.*, 2010) e a kisspeptina que tem papel inibidor ou estimulador do eixo H-H-G, variando entre diferentes espécies (Zohar *et al.*, 2010). Via corrente sanguínea, o FSH e o LH chegam às gônadas e estimulam a produção dos hormônios esteroides gonadais (Bombardelli *et al.*, 2006).

Em fêmeas, o FSH atua nas células da teca do folículo ovariano, estimulando as mesmas a captar o colesterol que é convertido em testosterona. Este andrógeno é transportado até as células foliculares onde atua a enzima aromatase que catalisa a conversão da testosterona em 17β -estradiol, principal estrógeno nos vertebrados (Baldisserotto, 2002). O 17β -estradiol, por sua vez age no fígado, estimulando a

síntese de vitelogenina, uma glicolipofosfoproteína, que promove o crescimento do oócito devido à incorporação de vitelo (processo também mediado pelo FSH), que posteriormente será utilizado para nutrição inicial das larvas (Lowe-McConnell, 1999; Scholz *et al.*, 2004). Na maioria das espécies de peixes estudadas até o momento, ainda na fase de vitelogênese, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de 17β -estradiol e testosterona, e esse aumento inibe a síntese de FSH, pelo processo conhecido como *feedback* negativo, e estimula junto com a ação do GnRH, a secreção de LH nas fases finais da vitelogênese (Swanson *et al.*, 2003). O LH estimula as células da teca a produzir o progestágeno 17α -hidroxiprogesterona (17α OHP), que é transportado até as células foliculares e convertido a 17α - 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α 20β DHP), principal progestágeno responsável pela maturação final dos oócitos e ovulação na maioria dos teleósteos (Lubzens *et al.*, 2010; Melamed *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 2003).

Retomando as características relacionadas à sazonalidade reprodutiva nos teleósteos, um gênero que até então se afirmava que a reprodução ocorria na primavera e verão é o *Astyanax* que tem 146 espécies válidas cadastradas (Fishbase, 2018) e tem uma ampla distribuição geográfica (Garutti e Britski, 1997). *Astyanax altiparanae* é uma das espécies desse gênero e se diferencia por apresentar coloração amarelada em sua nadadeira caudal e é conhecido popularmente como lambari-do-rabo-amarelo. Apesar do pequeno porte, é componente importante na cadeia alimentar do ecossistema, e tem um grande potencial para aquicultura por apresentar algumas características tais como, facilidade de manejo, aceitação de alimento artificial, dimorfismo sexual, alta prolificidade com o ciclo de crescimento curto, atingindo tamanho para comercialização em cerca de três meses (Gonçalves *et al.*, 2014; Porto-Foresti; 2010). Estas características têm levado recentemente o gênero *Astyanax* a ser considerado como um ótimo modelo experimental, principalmente em estudos que abordam biologia e fisiologia reprodutiva (Brambila-Souza, 2015; Costa, *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2013; Gomes, 2015; Jesus *et al.*, 2017; Tolussi *et al.*, 2018).

Outra característica interessante, e recentemente descrita em *A. altiparanae* é a capacidade de resposta à reprodução induzida artificialmente em cativeiro, fora do

período reprodutivo, mais especificamente no inverno (Evangelista *et al.*, 2015). Este fato pode ser possível devido ao rápido desenvolvimento ovariano (Lira *et al.*, 2018) e ao processo de vitelogênese desta espécie que aparentemente ocorrem ao longo do ano todo, em cativeiro, mesmo com as desovas registradas apenas no verão quando em ambiente natural (Jesus *et al.*, 2017). Esse fato é importante para o cultivo e comercialização de animais de cativeiro, possibilitando a produção da espécie em outros períodos do ano, reduzindo assim o intervalo de entressafra (Duncan *et al.*, 2013). No entanto, estudos recentes em cativeiro vêm demonstrando que, apesar da predominância de oócitos vitelogênicos ao longo de todo o ano, o Índice Gonadossomático (IGS) das fêmeas é significativamente mais baixo durante os meses de outono e inverno (Jesus *et al.*, 2017), sugerindo um desenvolvimento incompleto dos oócitos neste período.

Apesar dos recentes registros de reprodução de *A. altiparanae* fora do período reprodutivo e da plasticidade desta espécie nos processos de vitelogênese, os mecanismos fisiológicos que modulam esta dinâmica ainda não foram estudados. Considerando-se o exposto estudamos essas variáveis fisiológicas, principalmente na modulação do eixo hipófise-gônadas, de forma a aperfeiçoar técnicas que viabilizem este potencial reprodutivo fora da estação, ao que indica inerente à plasticidade reprodutiva da espécie. Os dados obtidos serão importantes para entender as variáveis fisiológicas que modulam a reprodução de animais migradores em cativeiro e como esta espécie mantém a função reprodutiva ativa, mesmo fora do período reprodutivo. Considerando-se que em cativeiro o processo de vitelogênese do *A. altiparanae* é plástico e os animais se mantêm com oócitos vitelogênicos nos ovários (Jesus *et al.*, 2017), este trabalho testou a hipótese que fêmeas mantidas em temperaturas elevadas e/ou induzidas com análogos de GnRH (GnRH α), mesmo no inverno, apresentam um aumento da expressão das gonadotropinas hipofisárias e conseqüentemente da concentração plasmática de estradiol e do hormônio indutor da maturação final (MIS, do inglês, *Maturation Inducing Steroid*), otimizando a reprodução fora da estação reprodutiva, possível nesta espécie.

2. OBJETIVO:

Avaliar as bases fisiológicas que modulam os processos de gametogênese, maturação final e ovulação em *A. altiparanae*, fora da estação reprodutiva, utilizando diferentes métodos de aplicação e doses de GnRHα aliados à manipulação térmica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Organismo/Local de estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Reprodução do CAUNESP, Jaboticabal-SP, Brasil (21°15'17 "S 48°19'20" W), local contemplado com doze caixas de 750l e 24 incubadoras de 5l para ovos e larvas. As caixas são interligadas em dois circuitos com seis caixas circulares, 12 incubadoras, um filtro biológico, um filtro UV e um trocador de calor cada, em um sistema fechado para manutenção das temperaturas. Foi feita uma retrolavagem dos filtros por dia, a temperatura, a concentração de oxigênio dissolvido e a condutividade elétrica (HANNA HI98312 DiST®6) foram aferidos uma vez ao dia durante os períodos experimentais. O laboratório possui janelas largas, facilitando a utilização do fotoperíodo natural. Os experimentos de desova foram conduzidos em caixas de transporte adaptadas e conectadas nas saídas de água das caixas experimentais, para obtenção das mesmas condições de temperatura, com capacidade de 3l cada.

As fêmeas de *Astyanax altiparanae* utilizadas neste estudo tinham um ano de vida e estavam mantidas nos viveiros escavados (5 x 10 m e 1,5 m de profundidade) do CAUNESP desde o nascimento, alimentadas com ração comercial (Nutripiscis® 1,7mm, 40%) cinco vezes por semana até o início do período experimental. Estas foram despescadas com rede de arrasto e pré-selecionadas visualmente de acordo com o tamanho, transportadas para o laboratório em sacos com água do próprio tanque e oxigênio e depois foram colocadas nas caixas. A temperatura na água das caixas foi alterada gradualmente (1°C / hora), até atingir as temperaturas desejadas. As temperaturas experimentais foram 27±2,8°C e 20±0,7 para o experimento de injeção (chamadas ao longo do texto de 27°C e 20°C) e 28±1,4°C e 20±0,7°C para o

experimento de implante (chamadas ao longo do texto de 28°C e 20°C). Nas caixas experimentais as fêmeas foram alimentadas uma vez ao dia até a saciedade com a mesma ração já descrita e as caixas foram sifonadas uma vez por semana.

3.2. Delineamento experimental

No inverno do ano 2016, nos meses de julho e agosto, foram conduzidos dois experimentos, sendo um com injeções de GnRH α e outro com implantes de GnRH α . Inicialmente, 240 fêmeas adultas de *A. altiparanae* (por experimento), foram divididas aleatoriamente em 12 tanques de 750l (20 animais / tanque) e 6 grupos experimentais foram estabelecidos (em duplicata), a fim de examinar o efeito combinado de temperatura e tratamento com GnRH α . Cada período experimental foi de 21 dias (três semanas). As doses sugeridas foram calculadas com base em experimentos realizados com outras espécies de teleósteos (Kagawa *et al.*, 2009; Kanemaru *et al.*, 2012). Medidas profiláticas foram tomadas e a taxa de mortalidade foi registrada.

No início do experimento de gametogênese (antes da primeira injeção ou implantação), no meio do período experimental (11 dias) e no final do experimento de gametogênese (21 dias), seis fêmeas foram amostradas em cada grupo experimental (três / tanque). Ao final deste período de 21 dias, quatro fêmeas de cada grupo experimental (duas/tanque) foram induzidas à ovulação e desova com uma injeção de 5000 UI/kg de gonadotrofina coriônica humana (hCG, ovidrel, Merck) e o mesmo número de animais (quatro fêmeas/grupo) foram injetados com solução salina, considerado como grupo controle.

As quatro fêmeas de cada um dos seis grupos experimentais (duas fêmeas de cada tanque replicado) foram colocadas na mesma caixa de desova de 2,5 L com 8 machos (6 caixas de desova com fêmeas injetadas com hCG e 6 injetadas com solução salina). Os machos foram induzidos à espermição com 3 mg/kg de extrato de hipófise de carpa. Os peixes foram mantidos na mesma temperatura do período experimental prévio e foram mantidas para desovar espontaneamente. Após a desova, a fecundidade, o desenvolvimento embrionário e a eclosão das larvas de

cada caixa de desova foram monitorados e as larvas foram acompanhadas até a abertura da boca (Figs. 1 e 2). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética nº 228/2015, Instituto de Biociências da USP.

3.2.1 *Experimento com injeções:*

As injeções de GnRHa [des-Gly10, D-Ala6] (L4513, *Sigma-Aldrich*) foram realizadas a cada 7 dias no período experimental de 21 dias, sendo então três injeções de 1,33ug/g (menor dose) e três de 2,66ug/g (maior dose) para a manutenção das doses finais de 4ug/g e 8ug/g respectivamente (Fig. 1). Os animais foram pesados individualmente a cada manipulação para a correta administração da dose. Assim foram formados os grupos:

Controle 20°C - Injeção de solução salina (no mesmo volume que nos grupos com GnRHa);

Menor dose 20°C - Injeção de GnRHa na dose final de 4 ug/g (final) ;

Maior dose 20°C - Injeção de GnRHa na dose de 8 ug/g (final);

Controle 27°C - Injeção de solução salina (no mesmo volume que nos grupos com GnRHa);

Menor dose 27°C - Injeção de GnRHa na dose final de 4 ug/g (final) ;

Maior dose 27°C - Injeção de GnRHa na dose de 8 ug/g (final).

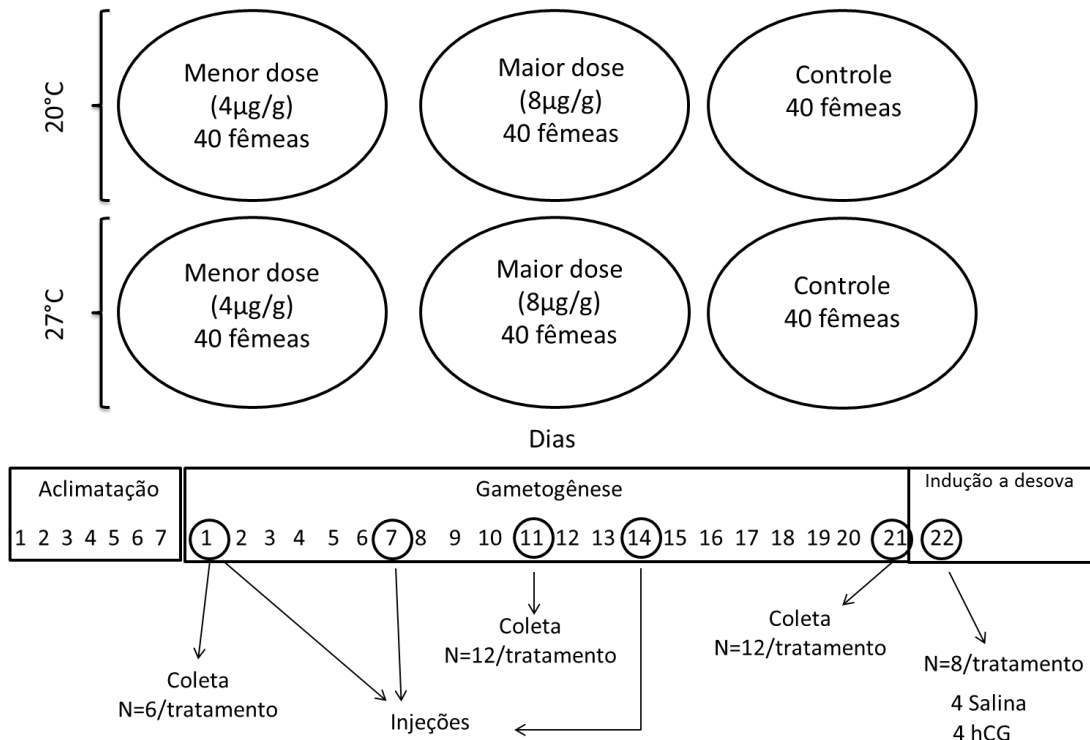


Figura 1: Indução de fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* à gametogênese, ovulação e desova. Injeções de GnRHa menor dose (4 µg/g) e maior dose (8 µg/g), divididas em 3 doses semanais, em 20°C ou 27°C. No final do período, os peixes de cada condição experimental foram tratados com hCG ou solução salina (controle), para induzir à ovulação e desova. As fêmeas foram mantidas na mesma temperatura durante todo o período experimental (aclimação, período de gametogênese e indução à ovulação e desova).

2.2.2. Experimento com implantes:

Os animais foram implantados uma única vez no final do período de aclimação nas mesmas doses de 4 e 8 µg/g de GnRHa, utilizando-se implantes preparados com EVAc (*ethylene-vinyl acetate*) (Mylonas e Zohar, 2001) contendo [D-Ala6, Pro9, NEt] GnRHa (*Bachem Bioscience, King of Prussia, PA*). Nos animais do grupo controle, foram implantados microchips do mesmo tamanho dos implantes e

sem a liberação de nenhum produto, apenas para simular a mesma incisão do implante de GnRH α (Fig. 2).

Controle 20°C – Implante de microchip;

Menor dose 20°C - Implante de GnRH α na dose final de 4 $\mu\text{g/g}$;

Maior dose 20°C - Implante de GnRH α na dose de 8 $\mu\text{g/g}$;

Controle 28°C – Implante de microchip;

Menor dose 28°C – Implante de GnRH α na dose final de 4 $\mu\text{g/g}$;

Maior dose 28°C - Implante de GnRH α na dose de 8 $\mu\text{g/g}$.

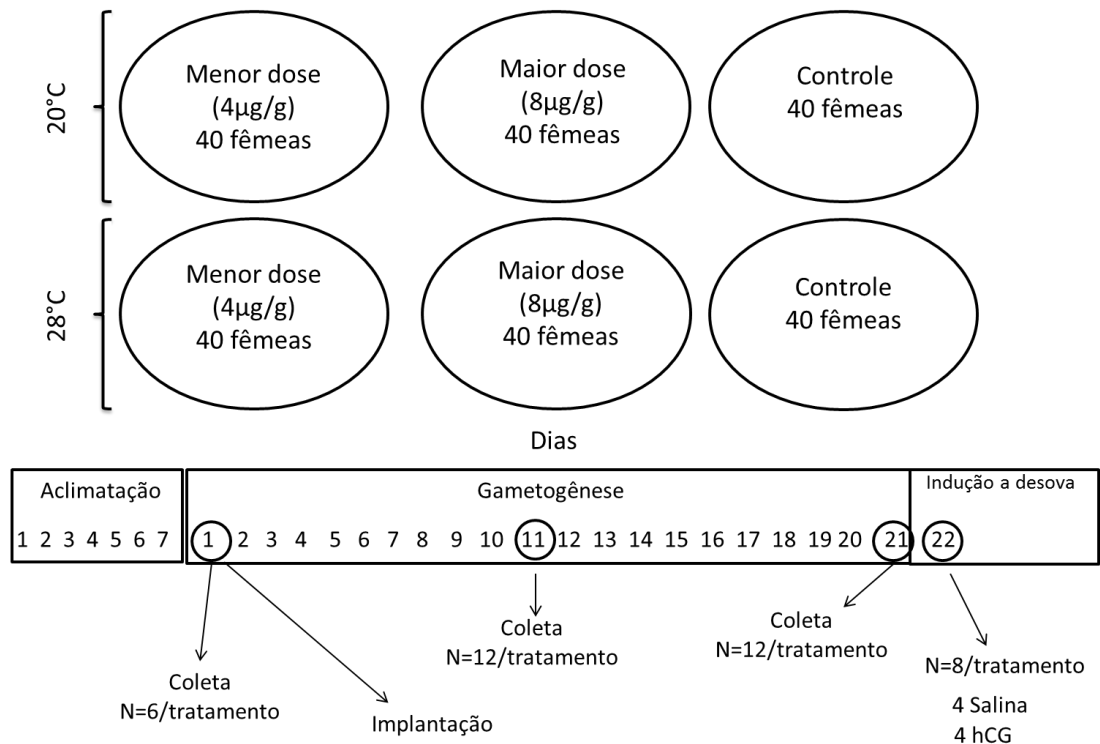


Figura 2: Indução de fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* à gametogênese, ovulação e desova. Implantes de GnRH α em menor dose (4 $\mu\text{g/g}$) e maior dose (8 $\mu\text{g/g}$), em 20°C ou 28°C. No final do período, os peixes de cada condição experimental foram tratados com hCG ou solução salina (controle), para

induzir à ovulação e desova. As fêmeas foram mantidas na mesma temperatura durante todo o período experimental (aclimatação, período de gametogênese e indução à ovulação e desova).

3. 3. Procedimentos específicos

3.3.1. Manipulação dos animais

Todas as fêmeas foram retiradas do viveiro com rede de arrasto e passaram por um período de aclimatação de sete dias, já nas temperaturas experimentais desejadas, nas caixas dentro do laboratório. Independente do experimento considerado, ao final do período todas as fêmeas passaram pelos mesmos procedimentos de coleta descritos abaixo.

Os animais foram anestesiados (1 g de benzocaína diluída previamente em 10 ml de etanol e em seguida em 10 litros de água) para coleta de sangue por punção da vasculatura caudal com seringas e agulhas descartáveis e heparinizadas (heparina sódica, Hepamax[®]). As amostras de sangue foram centrifugadas à 655,2 g por 5 minutos e o plasma foi congelado e mantido em freezer -80°C até o processamento. Em seguida os dados biométricos (cm) e ponderais (g) foram registrados, com o uso de ictiômetro e balança digital.

Após este procedimento as fêmeas foram eutanasiadas por secção da medula espinhal na altura do opérculo. Foi realizada uma incisão ventral no sentido caudocranial a partir do poro urogenital, os ovários foram retirados e pesados para o cálculo do Índice Gonadossomático (IGS), que expressa a porcentagem que os ovários representam em relação à massa total dos animais ($IGS = \text{massa das gônadas} \times 100 / \text{massa corpórea}$); uma porção dos ovários foi seccionada e armazenada para a caracterização histológica e outra para o cálculo da fecundidade e diâmetro dos oócitos. O fígado e a hipófise foram retirados, mantidos em RNA *later* por 24h e posteriormente congelados e mantidos no freezer em - 80°C para análise da expressão gênica de vitelogenina e das subunidades beta do *fsh* e *lh* respectivamente.

3.3.2. Análise da expressão gênica de vitelogenina e hormônios hipofisários (*fsh β* e *lh β*)

Extração do RNA total

Por conta de sua especificidade filogenética não existem no mercado kits comerciais para a determinação plasmática dos hormônios FSH e LH em teleósteos. Por este motivo o método mais preciso para avaliação da síntese destes hormônios é a expressão gênica da subunidade *beta* (β), específica de cada gonadotropina. A extração do RNA total das amostras individuais de hipófises previamente congeladas foram realizadas com o kit comercial (RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit) de acordo com as normas do fabricante.

O RNA total do fígado foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Sigma®) que consiste em uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina designado para isolar RNA total de alta qualidade de células e amostras de tecidos de acordo com as normas do fabricante. Para quantificação e análise da integridade do material foi feita uma averiguação pela análise da razão Abs260/Abs280 no aparelho Nanodrop™ Spectrophotometer (ND-1000) e foram utilizadas apenas amostras com a razão Abs260/Abs280 maiores que 1.7. O RNA purificado foi estocado e mantido em -80°C.

Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, foi utilizado kit comercial (*SuperScript™ II Reverse Transcriptase*). Em microtubos de 0,2ml foi adicionado 12 μ l de cada amostra na concentração de 10ng/ μ l para hipófise e 200ng/ μ l para fígado, de RNA. Em cada tubo foi acrescentado 1 μ l de Randon hexamer (50ng/ μ l), colocado no termociclador por 10 minutos a 70°C. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo para choque térmico (4°C), foi adicionado 5 μ l de buffer, 2,5 μ l de DTT e 1,25 μ l de dNTPs e colocado no termociclador em 25°C por 10 minutos. Foi dado um novo choque

térmico, adicionado 0,6µl da enzima e por fim as amostras foram colocadas no termociclador em 42°C por 50 minutos e em 70°C por 10 min, e estocado em -20°C.

PCR em tempo real

Os *primers* de PCR em tempo real para o gene da subunidade beta do *fsh* e *lh* desta espécie já foram desenhados por Jesus *et al.*, (2017) e o primer do gene da vitelogenina foi desenhado por Tolussi *et al.*, (2018) para *A. fasciatus* e testados para *A. altiparanae*. A reação de PCR em tempo real foi realizada usando 12,5µl de POWER SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.5 µM de primer (*forward* e *reverse*) e 2µl do cDNA. A reação foi incubada por 2 min à 50°C, 10 min a 95°C seguido por quarenta ciclos de 15 s a 95°C e 40 s a 60°C. Ao final destes ciclos foi realizada uma análise da *melt curve* para testar a especificidade da reação que foi feita em duplicata no *Step One Real Time- PCR System (Applied Biosystems)*. O gene *β-actina* foi usado como uma referência endógena para a análise da expressão relativa da subunidade beta do *fsh*, *lh* e *vtgA*. A expressão gênica foi calculada de acordo com o valor de Ct, que foi normalizado pelo $\Delta\Delta Ct$ (ddct) com o gene endógeno (Livak e Schmittgen, 2001).

3.3.3. Análises de esteroides

O estrógeno 17β-estradiol (E2) foi quantificado no plasma pelo método de elisaimunoensaio (ELISA), com uso de kits comerciais da IBL® (*International/ Hamburg, Germany*). As análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram testadas para acerto da diluição, e como as concentrações ficaram acima da curva padrão foi necessária a diluição na relação de 1:2, utilizando-se como diluidor o tampão EIA buffer (*Cayman Chemical*®). O limite de detecção do teste é de 9,7 pg/ml. A absorbância foi medida utilizando um leitor de microplacas (*Spectra Max 250 Molecular Devices*) em 450 nm. As amostras foram dosadas em duplicata de acordo com instruções do fabricante. O coeficiente de variação intraensaio (CV) (18,0%) foi calculado considerando as duplicatas das

amostras na mesma placa, enquanto o CV interensaio foi calculado considerando-se amostras analisadas em diferentes placas (17,5%).

O progestágeno 17α - 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (do inglês, *maturation inducing steroid*, MIS) também foi quantificado no plasma com uso de kit comercial da Cayman Chemical[®] de acordo com as normas do fabricante. A melhor diluição variou de acordo com animais tratados ou não com hCG em 1:70 e 1:30 respectivamente, as diluições foram feitas também com EIA buffer (Cayman Chemical[®]). O limite de detecção do teste é de 15pg/ml e a absorbância foi medida no equipamento citado anteriormente em 405 nm. O coeficiente de variação intraensaio (CV) (19,3%) foi calculado considerando as duplicatas das amostras na mesma placa, enquanto o CV interensaio foi calculado dentro das amostras analisadas em diferentes placas (12,3%).

3.3.4. Análises morfológicas:

Histologia dos ovários

Para verificar o estágio de maturação gonadal, as amostras retiradas do terço médio do ovário direito foram fixadas em bouin acético (750 ml de solução de ácido pícrico saturada, 200 ml de formol e 50 ml de ácido acético glacial) por 24 horas. Após este período de fixação no bouin acético as amostras foram lavadas em água corrente e armazenadas em etanol 70⁰GL. Para o procedimento histológico as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol (*dimethybenzene*) e incluídas em paraplast[®]. Em seguida foram cortadas em micrótomo (Leica – RM/2255, equipado com navalhas descartáveis) em nove cortes de 5µm de espessura por amostra, e montados em lâminas e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (Behmer *et al.*, 1976). Após a coloração, os cortes foram novamente desidratados e diafanizados para fechamento da lâmina com lamínula e goma Damar.

O estágio de maturação do ovário foi classificado como crescimento primário (apenas ovócitos perinucleares), crescimento secundário (vitelogênese precoce com ovócitos alveolares corticais), crescimento terciário (vitelogênese com gotículas

lipídicas formando grânulos de vitelo), crescimento final (migração nuclear) ou maduro (oócito ovulado e folículo pós-ovulatório) (Rocha e Rocha, 2006) de acordo com o estágio de desenvolvimento do oócito baseado nos tipos celulares predominantes de acordo com West (1990) e usando uma análise qualitativa de lâminas histológicas, documentando a presença / ausência (+/-) e presença frequente / predominante (++) / (+++) dos tipos celulares (Gomes *et al.*, 2015).

Determinação da fecundidade e diâmetro dos oócitos

A fecundidade é definida como o número de oócitos liberados a cada desova (Vazzoler, 1996), sendo assim avaliada em fêmeas em crescimento terciário. Para a análise da fecundidade e do diâmetro oocitário, as amostras da porção média do ovário direito, devidamente pesados, foram fixadas em líquido de Gilson (Simpson, 1951) e o tecido permaneceu nesta solução por cerca de 30 dias para a dissolução de tecido envoltório.

Após a total dissolução dos tecidos envoltórios, os oócitos foram transferidos para etanol 70^o GL. Para o procedimento de mensuração e contagem dos oócitos estes foram ressuspensos em 1L de etanol 70^oGL e retirado 2ml do homogeneizado de oócitos com uma pipeta Stempel (Hensen Stempel PipetteTM 1806 series; Wildlife Supply Company, Florida, USA) . Esta subamostra foi transferida para uma placa de acrílico milimetrada para a medição e contagem dos oócitos com o uso de microscópio e do programa *Leica DM1000 (light microscope, Leica DFC295 photographic camera and image capture Leica Application Suite Professional, LASV3.6)*. Os diâmetros foram divididos em onze classes: 0 a 100µm, 101 a 200µm e assim sucessivamente até 1000 a 1100µm para se encontrar a porcentagem de oócitos em cada classe de diâmetro. Foram considerados como vitelogênicos os oócitos com diâmetros acima de 601 µm, pois foi a partir deste diâmetro que eles se apresentaram opacos e com coloração escura caracterizando aspecto de vitelogênico. Todo este processo foi feito em triplicata. Após as medidas e contagens dos oócitos foi feita uma média da triplicata e foram calculadas a fecundidade absoluta (FA), e fecundidade relativa à massa corpórea (FR).

3.3.5. *Parâmetros reprodutivos*

Em cada grupo experimental, o sucesso da fertilização (Fertilização = número de ovos fertilizados x 100 / número total de ovos) foi calculado a partir dos dados obtidos na caixa experimental. Para calcular o desenvolvimento embrionário e a sobrevivência larval, os ovos fertilizados foram colocados individualmente em placas de microtitulação de 96 poços (em duplicata), cobertos com uma tampa de plástico e mantidos sob a temperatura de desova até a eclosão. O desenvolvimento embrionário e larval precoce foi avaliado com estereomicroscópio uma vez ao dia, sendo o número de embriões vivos registrados 24 h após a coleta dos ovos. Larvas eclodidas e viáveis, bem como a absorção do saco vitelino também foram documentadas. A sobrevivência dos embriões foi calculada como o número de ovos com embriões vivos / número total de ovos fertilizados carregados nas placas de microtitulação. A eclosão foi calculada como o número de ovos eclodidos / número de embriões vivos no dia 1. A sobrevivência das larvas foi calculada como o número de larvas vivas no dia da abertura da boca / número de ovos eclodidos. As Unidades Térmicas Acumuladas (UTA) de desova e incubação foram calculadas (temperatura em graus Celsius * quantidade em horas).

3.4. *Análise dos dados*

Os dados foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão da média). O IGS, fecundidade relativa, diâmetro do oócito, concentração plasmática de E2, expressão gênica de FSH, LH e vitelogenina foram comparados com uma análise de Modelo Linear Geral (GLM) seguida de testes *post hoc* de Bonferroni com os fatores "Tratamento" (tratamento GnRHa durante o período de gametogênese) e "Temperatura" e suas interações. Inicialmente, consideramos o "Tempo" (os três tempos de amostragens durante o período de gametogênese) como fator usando as mesmas análises estatísticas, mas não foram encontradas diferenças estatísticas, sendo o fator "Tempo" não considerado na análise estatística. A concentração do MIS foi comparada com a análise GLM seguida de testes *post hoc* de Bonferroni com

os fatores "GnRHa" (gametogênese), "hCG" (indução à desova), "Temperatura" e suas interações. Em todas as análises, o nível de significância foi de 95% ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote IBM SPSS Statistic 22.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento Injeção

4.1.1. Análise da expressão gênica de hormônios hipofisários (*fsh β* e *lh β*) e vitelogenina

A manipulação térmica e as injeções de GnRHa tiveram uma interação significativa na expressão do gene *fsh β* durante o período de gametogênese ($P = 0,01$), com níveis crescentes de GnRHa resultando em maior expressão do gene *fsh β* em fêmeas expostas a 27°C (Fig. 3A).

Da mesma forma, a manipulação térmica e as injeções de GnRHa também tiveram uma interação significativa na expressão do gene *lh β* durante o período de gametogênese ($P = 0,01$) em 20°C, mas o efeito foi oposto ao *fsh β* (Fig. 3B). As fêmeas expostas a 27°C tiveram expressão do gene *lh β* significativamente menor, enquanto a terapia com GnRHa na dose mais alta reduziu a expressão do gene *lh β* significativamente nas fêmeas mantidas em 20°C.

A manipulação térmica e as injeções de GnRHa não tiveram interação significativa na expressão do gene *vtgA* durante o período de gametogênese ($P = 0,10$), mas as fêmeas expostas a 20°C tiveram expressão do gene *vtgA* significativamente menor quando administradas com GnRHa (Fig. 3C).

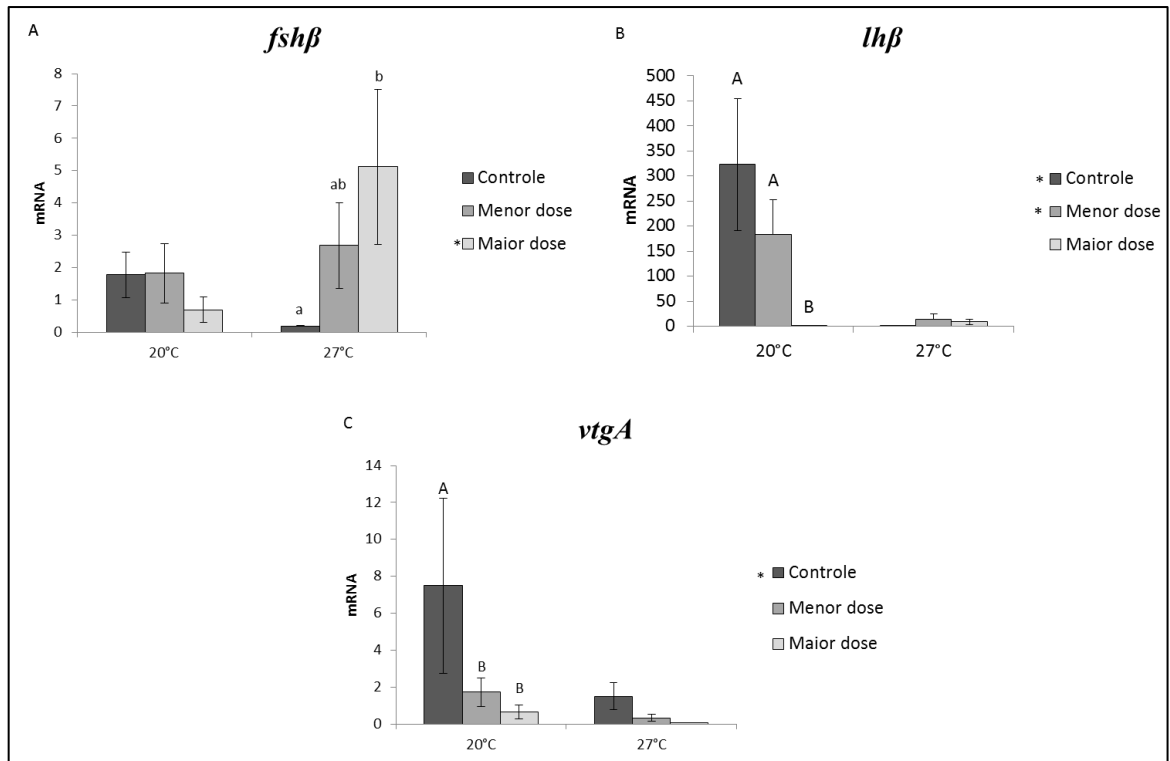


Figura 3: Expressão dos genes *fshβ* (A), *lhβ* (B) e *vtgA* (C) em fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de injeções de GnRH. Asteriscos expressam diferenças estatísticas entre temperaturas no mesmo tratamento com GnRH; Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos GnRH a 20°C e minúsculas em 27°C (P < 0,05).

4.1.2. Análises de esteroides

A manipulação térmica e as injeções de GnRH tiveram interação significativa nos níveis plasmáticos de E2 durante o período de gametogênese (P = 0,04), com níveis crescentes de GnRH resultando em menor concentração plasmática de E2 em fêmeas expostas a 20°C, mas não em 27°C (Fig. 4).

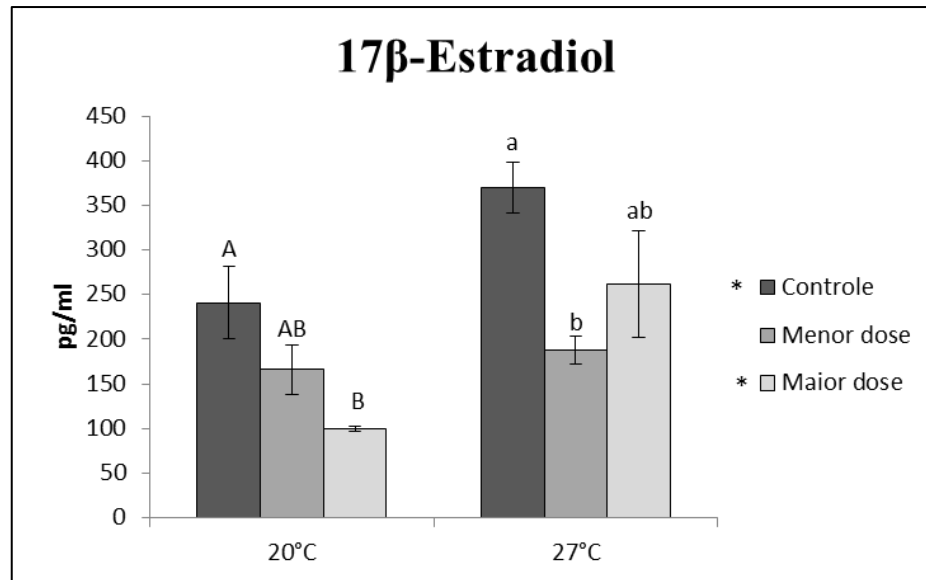


Figura 4: Concentração plasmática de 17 β -estradiol (média \pm EPM) em fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de injeções de GnRH α . Asteriscos expressam diferenças estatísticas entre temperaturas no mesmo tratamento com GnRH α ; Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos GnRH α em 20°C e minúsculas em 27°C (P <0,05).

Os animais de todos os grupos experimentais induzidos com solução salina não mostraram diferenças estatísticas nos níveis plasmáticos de MIS, e mantiveram níveis baixos deste hormônio quando comparados com as fêmeas induzidas com hCG (Fig. 5). Todos os animais, exceto aqueles do grupo controle, mantidos em 27°C, tiveram sucesso na desova após a injeção com hCG e exibiram níveis plasmáticos mais elevados de MIS quando comparados aos animais injetados com salina, enquanto todos os animais injetados com solução salina não desovaram. Os animais do grupo controle mantidos em 27°C durante o experimento de gametogênese, não exibiram qualquer aumento na concentração plasmática do MIS após o tratamento com hCG, e os níveis de MIS foram significativamente inferiores aos níveis dos peixes injetados com hCG no grupo controle em 20°C (P = 0,150). Os níveis de MIS dos animais deste grupo foram também significativamente menores quando comparados aos outros animais tratados com hCG e mantidos em 27°C (P =

0,015 para menor dose e $P = 0,001$ para maior dose) (Fig. 5). Houve interação significativa entre o tratamento com GnRH α , temperatura e injeção de hCG ($P=0,0001$).

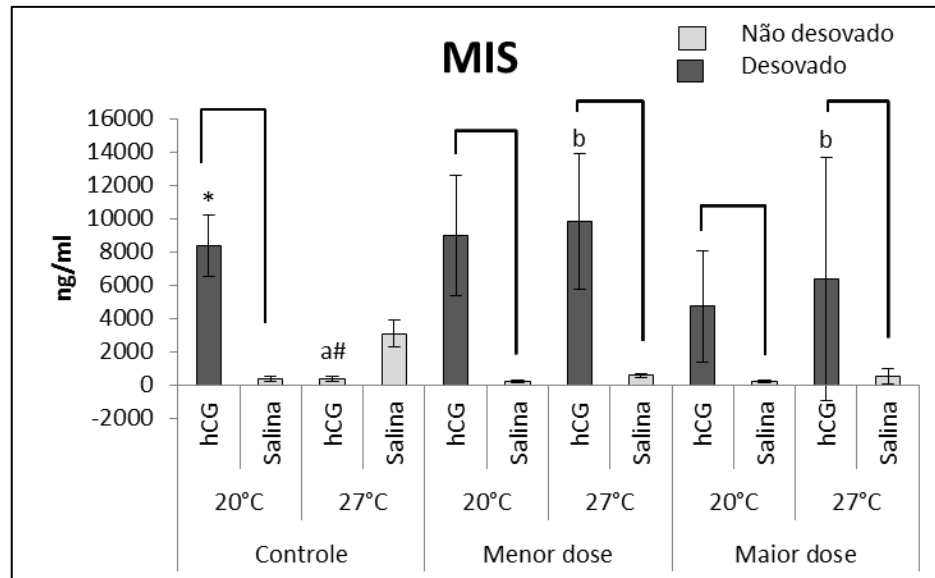


Figura 5: Concentração plasmática (média \pm EPM) de 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona em fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de injeção de GnRH α e induzidos à desova com hCG. Barras claras significam animais que não desovaram e barras escuras que desovaram. Os colchetes significam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre hCG e salina; símbolos significam diferenças entre temperaturas dentro do mesmo tratamento e letras significam diferenças entre tratamentos de GnRH α .

4.1.3. Análises morfológicas

Índice Gonadossomático, diâmetro dos oócitos e fecundidade relativa

Os valores de IGS (Fig. 6b) e diâmetros dos oócitos (Fig. 6a) permaneceram as mesmas durante todo o experimento em todos os tratamentos com GnRH α , independentemente da temperatura. No entanto, a fecundidade relativa foi maior nos peixes que receberam a maior dose de GnRH α quando comparados aos animais

mantidos em 20°C, enquanto em 27°C os peixes que não foram tratados com GnRH α apresentaram a maior fecundidade (Fig. 6c).

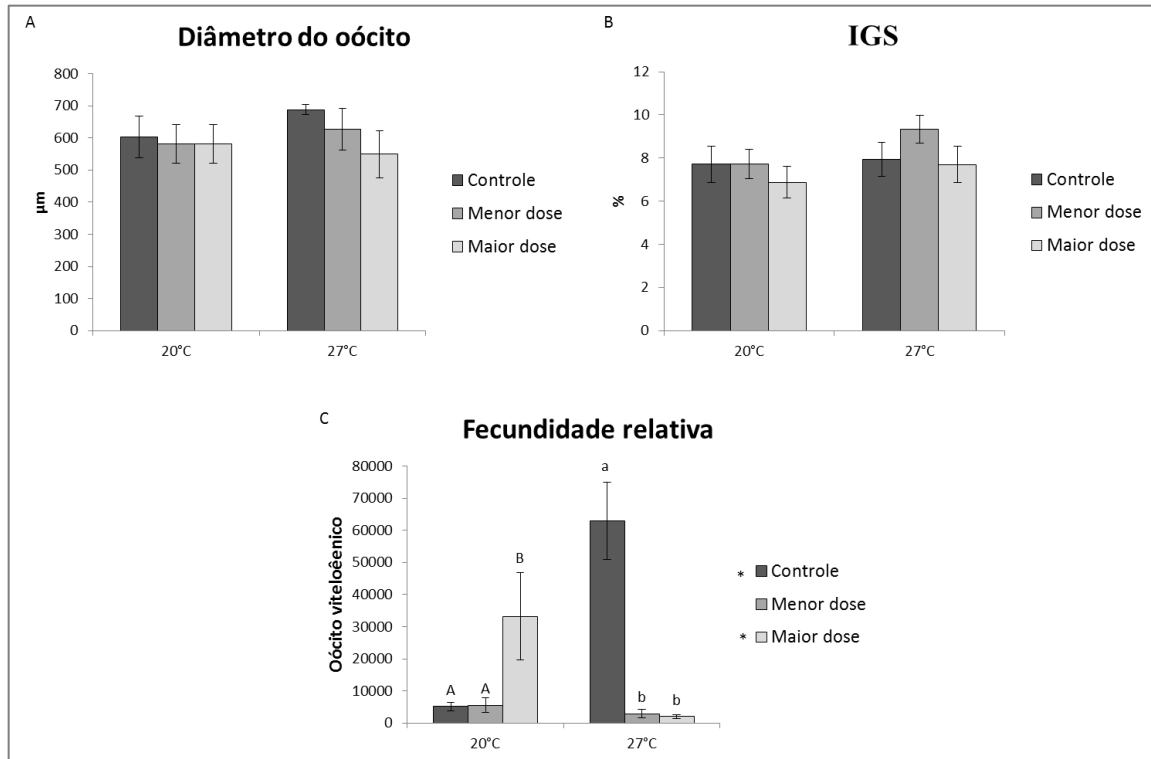


Figura 6: Diâmetro do oócito (A), Índice Gonadosomático (IGS) (B) e Fecundidade relativa (C) (média \pm EPM) em fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de injeções de GnRH α . Asteriscos expressam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre temperaturas no mesmo tratamento com GnRH α . Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos com GnRH α em 20°C e minúsculas em 27°C.

Histologia dos ovários

Todos os animais de todos os grupos exibiram a mesma proporção de oócitos perinucleolares (PN) e vitelogênicos (V) nos ovários que foram classificados como crescimento terciário (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos estádios de maturação dos ovários de acordo com a fase do desenvolvimento oocitário em *A. altiparanae* expostos a manipulação termal e injeções de GnRHa.

Tratamento	Temperatura	Fase do desenvolvimento oocitário					POF	Estágio de maturação
		PN	CA	V	Migração Nuclear	A		
Controle	20°C	++	-	++	-	-	-	Crescimento terciário
	27°C	++	+	++	-	-	-	Crescimento terciário
Menor dose	20°C	++	-	++	-	-	-	Crescimento terciário
	27°C	++	+	+++	-	-	-	Crescimento terciário
Maior dose	20°C	++	+	++	-	-	-	Crescimento terciário
	27°C	++	+	++	-	-	-	Crescimento terciário

PN: perinucleolar; CA: cortical alveolar; V: vitelogênico; A: atrésico; POF: folículo pós-ovulatório; + presente; ++ frequente; +++ predominante; - ausente.

4.1.4. Parâmetros reprodutivos

As fêmeas induzidas com solução salina não desovaram. Animais induzidos com hCG desovaram em todos os grupos com exceção dos animais do grupo controle mantidos em 27°C. A maior quantidade de oócitos foi observada nos animais injetados com a menor dose de GnRHa e mantidos em 27°C, porém suas taxas de fertilização e eclosão se mantiveram em 50%. Foi feita uma estimativa de número larvas de acordo com a quantidade de ovos e suas respectivas taxas, e os melhores valores foram encontrados nas fêmeas tratadas previamente com GnRHa na maior dose. Animais do grupo controle mantidos em 20°C desovaram, porém com

pouca quantidade de ovos e baixas taxas de fertilização e eclosão. Após a eclosão não houve mortalidade das larvas até a abertura de boca e ingestão de alimento vivo (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros reprodutivos em fêmeas de *A. altiparanae* induzidas a ovulação após 21 dias de injeções de GnRHa

Tratamento	Temperatura	Número de ovos	Taxa de fertilização (%)	Taxa de eclosão (%)	Horas graus	Número estimado de larvas
Controle	20°C	4.010	42	10	330	1.684
	27°C			Não desovou		
Menor dose	20°C	8.340	70	47	340	2.743,9
	27°C	18.360	50	50	140	4.590,0
Maior dose	20°C	7.960	92	73	340	5.345,9
	27°C	9.648	88	83	280	7.046,9

4.2. Experimento com implantes de GnRHa

4.2.1. Análise da expressão gênica de hormônios hipofisários (*fsh β* e *lh β*) e vitelogenina

Os implantes de GnRHa e a terapia térmica resultaram em uma interação significativa na expressão do gene *fsh β* durante o período de gametogênese ($P = 0,027$), com a maior dose de GnRHa resultando em maior expressão do gene *fsh β* em fêmeas mantidas em 28°C (Fig.7A). Da mesma forma, a manipulação térmica e implantação de GnRHa também apresentaram uma interação significativa na expressão do gene *lh β* durante o período de gametogênese ($P = 0,009$), com efeito similar ao *fsh β* (Fig. 7B). Ou seja, a maior dose de GnRHa resultando em maior expressão do gene *fsh β* e *lh β* em fêmeas mantidas em 28°C.

Quanto à expressão genica de *vtgA* houve interação significativa durante o período de gametogênese ($P = 0,0001$), com a maior dose de GnRH α resultando em maior expressão, porém em fêmeas mantidas em 20°C, e sem alteração dos níveis de expressão nos animais mantidos em 28°C (Fig. 7C).

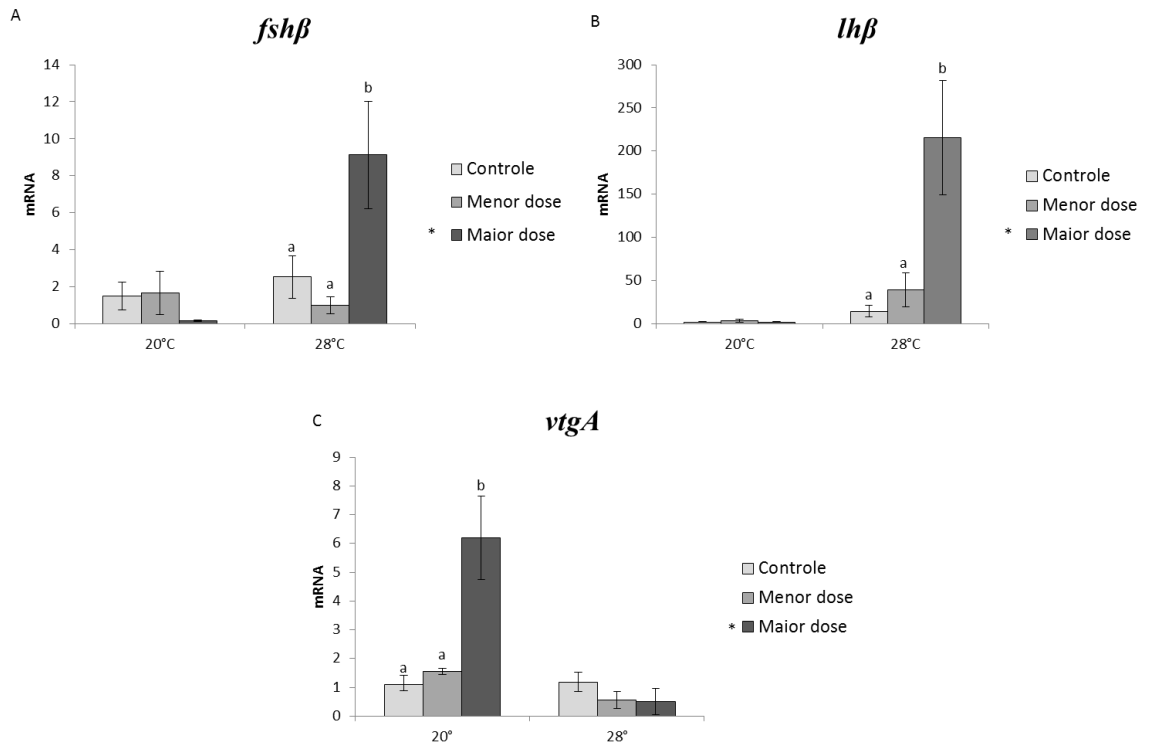


Figura 7: Expressão dos genes *fshβ* (A), *lhβ* (B) e *vtgA* (C) em fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias com implantes de GnRH α . Asteriscos expressam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre temperaturas no mesmo tratamento com GnRH α . Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com GnRH α na mesma temperatura.

4.2.2. Análise plasmática de esteroides

A manipulação térmica e implantação de GnRH α não apresentaram interação significativa nos níveis plasmáticos de E2 durante o período de gametogênese ($P = 0,097$), mas os animais mantidos na temperatura mais elevada, sem administração de GnRH, apresentaram aumento da concentração plasmática deste esteroide (Fig. 8)

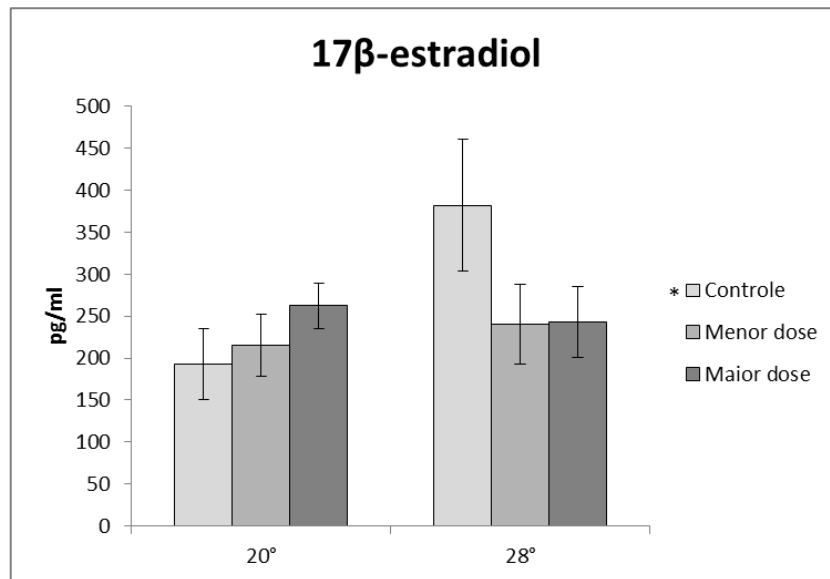


Figura 8: Concentração plasmática de 17 β -estradiol (média \pm EPM) em fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias com implantes de GnRH α . Asteriscos expressam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre temperaturas, no mesmo tratamento com GnRH α .

Os animais de todos os grupos experimentais induzidos com solução salina não mostraram diferenças estatísticas nos níveis de MIS, e mantiveram níveis baixos deste hormônio quando comparados com as fêmeas induzidas com hCG (Fig. 49sol). Todos os animais, exceto aqueles do grupo controle mantidos em 28°C, tiveram sucesso na desova após a injeção com hCG e exibiram níveis mais elevados de MIS do que o grupo injetado com salina, enquanto todos os animais injetados com solução salina não desovaram. Conforme houve o aumento da dose de GnRH α na gametogênese houve também um aumento significativo na concentração plasmática de MIS nas fêmeas induzidas à ovulação com hCG. Houve interação significativa entre a implantação de GnRH α , temperatura e injeção de hCG ($P=0,0001$, Fig.9).

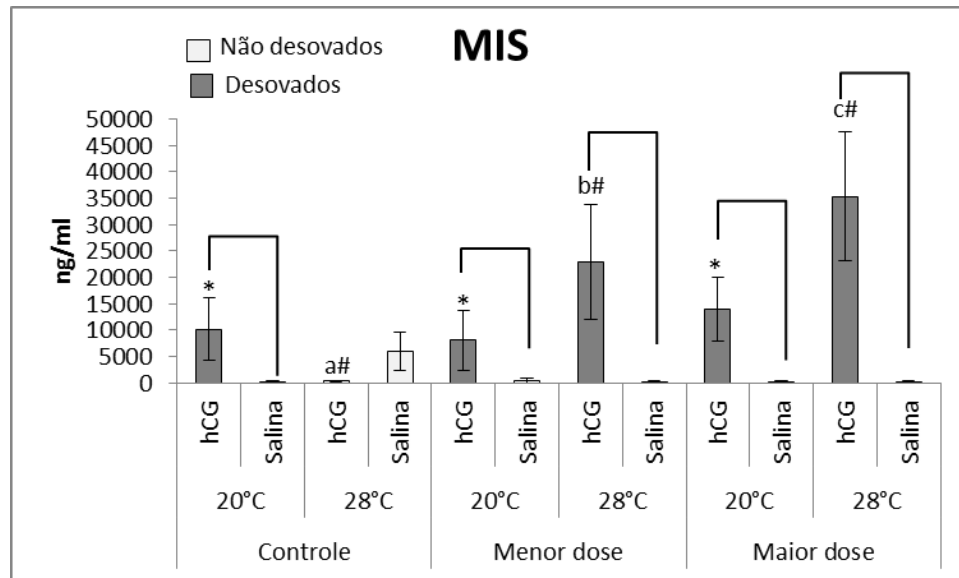


Figura 9: Concentração plasmática de 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (média \pm EPM) em fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias de implante de GnRH_a e induzidos à desova com hCG. Barras claras significam animais que não desovaram e barras escuras animais que desovaram. Os colchetes significam diferenças estatísticas (P <0,05) entre hCG e salina; símbolos diferentes significam diferenças entre temperaturas dentro do mesmo tratamento e letras diferentes significam diferenças entre tratamentos de GnRH_a.

4.2.3. Índice Gonadossomático

A manipulação térmica e os implantes com GnRH_a não apresentaram interação significativa nos valores de IGS (P=0,177), mesmo assim fêmeas mantidas em 20°C apresentaram diminuição do IGS no grupo implantado com a maior dose de GnRH_a (P=0,008) (Fig.10).

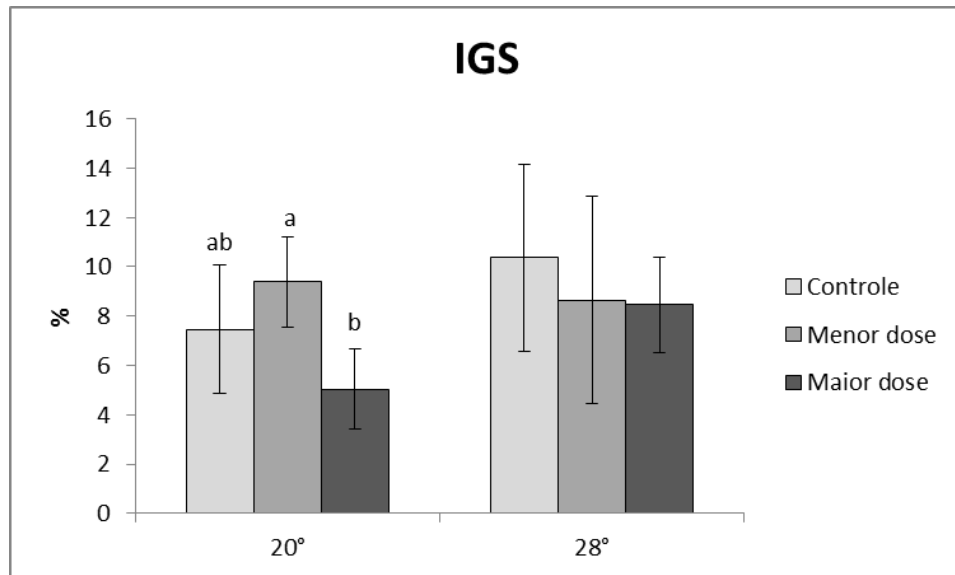


Figura 10: Índice Gonadosomático (IGS) (média \pm EPM) em fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 21 dias com implantes de GnRHa. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos com GnRHa nas mesmas temperaturas.

4.2.4. Parâmetros reprodutivos

Animais do grupo controle mantidos em 28°C induzidos com hCG não desovaram. As taxas de fertilização para este experimento foram muito baixas enquanto que as taxas de eclosão foram todas acima de 70%. A maior desova em números absolutos se deu em animais do grupo implantados com a maior dose de GnRHa e mantidos em 20°C que por sua vez também apresentaram a maior taxa de fertilização e eclosão, gerando assim um maior número estimado de larvas para este grupo. Animais do grupo controle mantidos em 20°C desovaram, porém com índices muito baixos gerando assim um número estimado de larvas inferior aos demais grupos (Tabela 3). Depois da eclosão foi calculada a mortalidade das larvas até a abertura de boca, sendo de 3% para o grupo controle, 2% para o grupo de menor dose de GnRH em ambas as temperaturas e 1% para o grupo de maior dose de GnRH, em ambas as temperaturas.

Tabela 3: Parâmetros reprodutivos em fêmeas de *A. altiparanae* induzidas à ovulação após 21 dias com implantes de GnRH α

Tratamento	Temperatura	Número de ovos	Taxa de fertilização (%)	Taxa de eclosão (%)	Horas graus	Número estimado de larvas
Controle	20°C	3.564	28	62	324	609,9
	28°C			Não desovou		
Menor dose	20°C	7.718	53	72	270	2.939,6
	28°C	8.340	27	72	168	1.620,1
Maior dose	20°C	12.662	55	77	280	5.352,6
	28°C	4.884	38	77	243,6	1.429,4

5. DISCUSSÃO

5.1. Experimento Injeção

O lambari faz pequenas migrações dentro de seu ambiente natural durante o período reprodutivo (Carolsfeld *et al.*, 2003), e exibe um desenvolvimento ovariano assincrônico com múltiplas desovas dentro da época reprodutiva, ou seja, no verão. No entanto, quando mantidas em cativeiro, as fêmeas não desovam sem manipulações hormonais ou ambientais (Chehade *et al.*, 2015; Jesus *et al.*, 2017). Estudos prévios com *Astyanax altiparanae* (Jesus *et al.*, 2017) e o congênere *A. fasciatus* (Tolussi *et al.*, 2018) demonstraram que as fêmeas mantêm oócitos vitelogênicos em seus ovários durante todo o ano, tanto em cativeiro quanto na natureza; parecendo aptos portanto, à indução a desova induzida o ano todo. No presente estudo, demonstramos que a manipulação térmica durante o inverno, juntamente com o tratamento com induções hormonais, são necessários para otimizar a produção de gametas e a disponibilidade de larvas.

O papel da FSH é bem conhecido na reprodução de peixes, estimulando a proliferação das oogônias e a produção de E2, que por sua vez regula a vitelogênese pelo crescimento do oócito (Lubzens *et al.*, 2010). A expressão gênica de *fshβ* em fêmeas de lambari não se alterou com injeções de GnRHa nos animais mantidos em temperatura natural de inverno (20°C). Porém quando as fêmeas foram expostas às temperaturas de verão (27°C) durante o inverno e foram injetadas com GnRHa, a expressão do gene *fshβ* aumentou, resultando também em maiores níveis plasmáticos de E2. No entanto, na ausência de injeções de GnRHa, apenas o aumento na temperatura foi capaz de aumentar os níveis de E2, indicando que outros fatores além do FSH plasmático também podem estar regulando a produção de E2. Nas temperaturas de verão ou inverno, as injeções de GnRHa foram acompanhadas por uma diminuição nos níveis de E2, talvez devido à resposta de feedback do aumento da expressão do gene *fshβ*. A expressão de *fshβ* nesta espécie foi avaliado ao longo do ciclo reprodutivo em fêmeas mantidas em cativeiro, sendo maior no verão e decrescente do outono para o inverno (Jesus *et al.*, 2017),

demonstrando o importante papel das pistas ambientais na produção desse hormônio.

E2 estimula a síntese de VTG hepática em teleósteos e a expressão de *vtgA* foi maior em lambaris mantidos em 20°C quando comparado com 27°C. O aumento da VTG pinocitado pelos oócitos pode alterar a síntese hepática de VTG, suprimindo a produção de E2 (Reading *et al.*, 2017) e a temperatura parece estar afetando esse processo. Quando as fêmeas foram tratadas com GnRHa a vitelogênese já estava em andamento, o que pode explicar os efeitos observados apenas na temperatura mais baixa, sendo que a diminuição de E2 no grupo injetado com maior dose de GnRHa refletiu menor expressão do gene *vtgA*, sugerindo que GnRHa compensou o efeito da temperatura baixa. Os oócitos provavelmente atingiram o diâmetro apropriado para maturação e ovulação com antecedência quando suplementados com GnRHa, possivelmente devido ao feedback negativo de E2, que foi associado com menor expressão do gene *vtgA* a 20°C. Durante a fase de vitelogênese, o aumento dos ovários é alcançado principalmente devido à incorporação de VTG produzida no fígado, em resposta ao aumento dos níveis plasmáticos de E2 (Lubzens *et al.*, 2010). Apesar das diferenças encontradas nos níveis de *fshβ*, *vtgA* e E2, não houve alteração no IGS, diâmetro do oócito e histologia gonadal nos diferentes grupos experimentais. Porém a temperatura parece modular o número de oócitos vitelogênicos, pois quando as fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo foram mantidas em temperaturas mais baixas, uma dose maior de GnRHa compensou a fecundidade relativa.

Quando os oócitos completam a vitelogênese, há uma diminuição nos níveis de FSH em resposta ao *feedback* negativo de E2 na hipófise, e há um *feedback* positivo na síntese de LH juntamente com a ação do GnRH do hipotálamo (Levaviv-Sivan *et al.*, 2010). O LH estimula as células da teca a produzir 17 α -hidroxiprogesterona (17 α OHP), que é transportado para as células foliculares e é convertido em 17 α -20 β -di-hidroxi-4-pregnen-3-ona (17 α 20 β DHP), o MIS que induz a maturação do oócito na maioria teleósteos (Lubzens *et al.*, 2010). Neste estudo, a expressão do gene *lhβ* foi maior em 20°C, como compensação da menor temperatura, exceto quando GnRHa foi injetado na maior dose, quando

provavelmente essa compensação não foi necessária devido à maior estimulação de GnRH. No entanto, quando as fêmeas de todos estes grupos foram induzidas a desovar com hCG, no final do período de exposição ao GnRHa, os níveis de MIS após a desova não foram diferentes nas fêmeas expostas às diferentes condições experimentais. Apenas as fêmeas do tratamento controle a 27°C não desovaram em resposta ao tratamento com hCG, provavelmente porque foi o grupo que apresentou os menores níveis plasmáticos de MIS, mesmo expressando *lhβ* durante o período de gametogênese, semelhante aos outros grupos. O LH estimula o deslocamento da via esteroidogênica do folículo ovariano da produção de E2 para a produção de MIS, que se liga em receptores de membrana dos oócitos ativando a síntese de fatores promotores de maturação que ativam a quebra da vesícula germinativa (Nagahama e Yamashita, 2008). Os resultados de *lhβ* combinados com o perfil MIS no lambari-do-rabo-amarelo sugerem que em temperaturas mais baixas o aumento da expressão do gene *lhβ* permite a produção de MIS em níveis que permitem a maturação do oócito, ovulação e desova. Quando o GnRHa foi injetado em maiores doses, não houve efeito de temperatura na expressão do gene *lhβ*.

A manipulação da temperatura e o tratamento com GnRHa durante o período de gametogênese influenciaram o desempenho na desova do lambari-do-rabo-amarelo, com fêmeas injetadas com maiores doses de GnRHa e mantidas a 27°C exibindo maior sucesso de eclosão e estimativa de produção de larvas. Esse resultado foi corroborado por Evangelista *et al.*, (2015), que manipularam temperatura e fotoperíodo durante a indução da desova da mesma espécie durante o inverno. Nossos dados demonstram que a suplementação prévia de GnRHa durante um período de 3 semanas otimiza o desempenho da desova, comparado com os efeitos da manipulação de temperatura.

5.2. Experimento Implante

Além do papel já bem conhecido de FSH na proliferação das oogônias e a produção de E2, que por sua vez regula o crescimento do oócito (Lubzens *et al.*, 2010, Luckenbach *et al.*, 2013) o FSH também exerce um papel de mediação da

pinocitose da VTG no oócito (Tyler *et al.*, 1991; Lubzens *et al.*, 2010).. Um estudo com *coho salmon*, *Oncorhynchus kisutch* relatou aumento significativo na expressão de receptores de FSH em oócitos perinucleolares e cortical alveolares (Luckenbach *et al.*, 2008). No presente estudo a implantação de GnRHa gerou diferenças significativas na expressão de *βfsh* somente em animais mantidos na maior temperatura. E mesmo com a concentração de E2 constante em todos os tratamentos e a expressão de *vtgA* alta nos animais de maior dose a 20°C, o IGS refletiu esse processo, pois animais tratados a 20°C tem o IGS menor, provavelmente pela não entrada de VTG, devido à baixa concentração de FSH circulante, já que a sua expressão está baixa. O papel do FSH exato na regulação da expressão de genes associados ao acúmulo de VTG ainda é desconhecido (Lubzens *et al.*, 2010).

Outro dado importante que este estudo demonstrou foi que apesar da utilização de implantes de GnRHa não aumentarem a expressão de *fshβ* em fêmeas mantidas a temperaturas de inverno o mínimo dessa expressão foi suficiente para manter a concentração plasmática de E2 constante em todos os grupos, tratados ou não com GnRHa. E ainda, ficou evidente que a manutenção dos animais não tratados em temperatura mais alta foi determinante para o aumento deste esteroide em relação a animais não tratados, mantidos em 20°C. Como já mencionado é indiscutível a importância do FSH para o gatilho da produção de esteroides, porém a importância de outros fatores, posteriores à ação desta gonadotrofina tem sido demonstrado (Young *et al.*, 2002). Vários relatos mostram que a estimulação por FSH na produção de E2 é acompanhada por aumento da expressão de um ou mais dos genes que codificam proteínas esteroideogênicas ovarianas, incluindo StAR, 3β-hidroxiesteroide desidrogenase e aromatase (Young *et al.*, 2002; Kagawa *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003).

A expressão de *vtgA* teve relação oposta à expressão de *fshβ* neste estudo, ou seja houve também aumento da expressão deste gene em animais implantados com a maior dose de GnRH, porém somente em fêmeas mantidas a 20°C, provavelmente pela necessidade da produção desta glicolipofosfoproteína no fígado destes animais a essa temperatura. O processo vitelogênico em animais mantidos

em 28°C aparentemente já estaria mais avançado, pois houve expressão das gonadotropinas aliadas a um IGS igualmente alto. Como já mencionado, durante o ciclo reprodutivo, o aumento da massa dos ovários é caracterizado principalmente pela captação de vitelogenina, em resposta à concentração plasmática de E2 (Lubzens *et al.*, 2010). Devido à estreita relação entre o processo de maturação gonadal, o aumento do volume e massa dos ovários, o valor de IGS é considerado como um parâmetro importante, e as análises temporais fornecem informações sobre o período reprodutivo das espécies (Vazzoler, 1996, Flores *et al.*, 2019).

Os dados de expressão de *βlh* corroboram com os de *βfsh*, ou seja, há aumento da expressão desses genes em animais implantados com a maior dose de GnRHa, mas apenas quando mantidos em altas temperaturas da água, parecendo não se expressar quando mantidos em 20°C. Esse perfil sugere que em temperaturas de inverno o implante não gerou respostas hipofisárias, principalmente de expressão de *βlh*, já em temperaturas mais elevadas, houve resposta ao implante. No entanto, mesmo com essa baixa expressão, a suplementação com hCG foi suficiente para a produção de MIS e consequente ovulação, pois animais tratados com GnRH, mesmo em 20°C desovaram. Já fêmeas do grupo controle em 27°C não desovaram e em 20°C desovaram com baixos índices reprodutivos e baixa estimativa de número de larvas. Este perfil sugere que nos animais não tratados previamente com GnRHa (controle) e mantidos em 28°C a falha na ovulação e desova se deu pela deficiência de produção do MIS e não por insuficiência de *lhβ*. Animais do mesmo grupo (controle), em 20°C obtiveram altas concentrações plasmáticas de MIS em relação aos animais injetados com salina, e desovaram, provavelmente por algum desencadeamento fisiológico não avaliado por este estudo que pode, por exemplo, estar relacionado ao estresse que acompanha estes processos reprodutivos. Animais desta espécie, em cativeiro, quando submetidos a altas densidades e aumento do volume de entrada de água no tanque desovam sem a necessidade de indução hormonal (no período de primavera/verão), e estes por sua vez tem um aumento na concentração plasmática de cortisol indicando assim uma desova por estresse (Chehade *et al.*, 2015; Parreira, 2015).

Como relatado anteriormente em todos os tratamentos nos quais houve desova, a contração do MIS esteve mais elevada nos animais estimulados com hCG, sendo que quanto maior a dose prévia de GnRH α , aliada às altas temperaturas, maior a concentração plasmática do MIS. Estes dados, porém não foram corroborados com os dados de desova, sendo que os melhores índices foram obtidos em animais administrados com a maior dose de GnRH α , mantidos em 20°C. A manipulação da temperatura aliada à manipulação do fotoperíodo, durante a indução à ovulação e desova em *A. altiparanae*, fora do período reprodutivo, resultou em resposta à indução hormonal, produção total de ovos e taxa de sobrevivência larval similares a animais induzidos durante o período reprodutivo sem manipulações ambientais (Evangelista *et al.*, 2015). Estes estudos prévios já vinham demonstrando que esta espécie tem a capacidade de se reproduzir (quando há manipulação ambiental) no inverno. Nossos dados investigaram as bases fisiológicas desta capacidade reprodutiva, demonstrando que se houver uma suplementação prévia de GnRH α , hormônio modulador do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas ocorre uma otimização dos parâmetros reprodutivos, mesmo fora da estação reprodutiva, demonstrando que ocorre um ajuste fisiológico nos animais de acordo com a situação a ele imposta.

5.3. Discussão geral

A análise dos dois experimentos em conjunto, demonstra que independente da forma de administração, a suplementação de fêmeas de *A. altiparanae* com GnRHa fora do período reprodutivo desencadeia alterações no eixo hipófise-gônadas, dependentes da temperatura de exposição, que aumenta a viabilidade na produção de larvas desta espécie, viabilizando uma maior produção no período de entressafra.

Mylonas *et al.*, (2015) compararam a cinética de desova e as características de produção e qualidade de ovos de múltiplas injeções de GnRHa versus implantes e demonstrou que o uso de injeção repetidas de GnRHa no *meagre* (*Argyrosomus regiuspode*) oferece vantagens significativas em relação ao uso de GnRHa de liberação controlada. Os autores relatam que ambos os métodos geraram resultados gerais semelhantes em termos de fecundidade relativa e qualidade de ovos/larvas, sucesso da eclosão e da sobrevivência larval, mas as injeções tiveram resultados mais consistentes de desova e podem oferecer melhor controle da produção de ovos. No presente estudo, mesmo os dados não sendo comparados estatisticamente entre os experimentos, em uma visão geral observamos resultados semelhantes aos descritos por Mylonas *et al.*, (2015) mostrando que as injeções repetidas desencadearam uma resposta mais evidente na hipófise de animais em baixas temperaturas, como por exemplo na expressão de *lhβ* e *vtgA*. Além disso, os dados dos índices de desempenho na reprodução induzida mostraram que a administração de GnRHa na forma de injeções foi mais eficiente na produção de larvas quando fêmeas e descendentes foram mantidos em temperaturas mais elevadas, enquanto o GnRHa na forma de implante resultou em maior produção estimada de larvas em temperaturas mais baixas.

Outro fator importante evidenciado nestes estudos foi que os animais dos grupos controle, de ambos os experimentos, ou seja, animais sem administração de GnRHa, não apresentaram muitas alterações fisiológicas, independente do experimento em questão, com exceção de duas variáveis analisadas, a expressão de *lhβ* e *vtgA* que apresentaram baixa expressão em 20°C no experimento de implante

porém tiveram seus maiores valores no experimento de injeção. Como já mencionado, os animais utilizados no experimento de injeção foram manipulados a cada 7 dias, mesmo aqueles dos grupos controle, nos quais foi injetado solução salina e os animais do experimento implante foram manipulados apenas no primeiro dia do experimento de gametogênese. Estas informações são relevantes considerando-se os processos aqui relatados de desova seguida de indução ao estresse destes animais (Chehade *et al.*, 2015; Parreira, 2015). A avaliação da condição de estresse dos animais não foi objetivo deste trabalho, mas pode explicar a desova dos animais mantidos em 20°C sem indução com GnRHa.

6. CONCLUSÃO

Em resposta ao objetivo inicialmente proposto, o presente estudo confirmou que fêmeas de *A. altiparanae* mantêm um grande número de oócitos vitelogênicos no inverno, e que é possível estimular a maturação final desses oócitos, produzindo ovos e larvas viáveis, após a indução hormonal com hCG. A manipulação térmica, com temperaturas de verão, aumentou o número de ovos e assegurou um bom desempenho reprodutivo em ambos os experimentos. No experimento de injeção, a manipulação térmica aliada à manipulação hormonal gerou resultados mais efetivos quando considerada a estimativa de produção de larvas, porém animais mantidos em baixas temperaturas e induzidos com GnRHa também apresentaram resultados expressivos, demonstrando que a indução à gametogênese por injeção gera ajustes fisiológicos em *A. altiparanae* otimizando os parâmetros reprodutivos. Já no experimento com implantes, as fêmeas mantidas em menores temperaturas e induzidas com GnRHa, apresentaram melhores resultados quando considerado o número estimado de larvas, mesmo sem variações fisiológicas tão evidentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, A.A.; Marques, E.E.; Agostinho, C.S.; Almeida, D.A.; Oliveira, R.J.; Melo, J.R.B.; 2007a. Fish ladder of Lajeado Dam: migrations on one-way routes? *Neotropical Ichthyology*, 5 (2): 121-130.
- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Pelicice, F.M. 2007b. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*, 50 p.
- Baldisserotto, B. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: UFSM, 2002.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Neto, A.G.F. 1976. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. EDART. São Paulo. Livraria Editora Ltda. 239p.
- Bombardelli, R.A.; Syperreck, M.A.; Sanches, E.A. 2006. Hormônio liberador de gonadotrofinas em peixes: aspectos básicos e suas aplicações. *Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR*, 9 (1): 59-65.
- Brambila-Souza, G. *Biologia reprodutiva de fêmeas de *Astyanax fasciatus* com números de cromossomos diferentes vivendo em ambiente natural e no cativeiro*, São Paulo, 47f. Dissertação (Mestrado) em Ciências - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia, USP, 2015.
- Bromage, N.; Porter, M.; Randall, C. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture*, 197: 63–98.
- Caneppele, D.; Honji, R.M.; Hilsdorf, A.W.S.; Moreira, R.G., 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 7 (4): 759-762.
- Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A.; 2003. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust, Victoria (org).
- Cehade, C., Cassel, M., Borella, M.I., 2015. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. *Neotropical Ichthyology*, 13 (1): 205–212.

- Costa, F.G.; Adolphi, M.C.; Gomes, C.C.; Jesus, L.W.O.; Batlouni, S.R.; Borella, M.I. 2014. Testes of *Astyanax altiparanae*: The Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis. *Micron*, 61: 20-27.
- Duncan, N.J.; Sonesson, A.K.; Chavanne, H. 2013. Principles of finfish broodstock management in aquaculture: control of reproduction and genetic improvement. In: Allan, G.; Burnell, G. *Advances in aquaculture hatchery technology*. Cambridge: Woodhead Publishing. 23-75.
- Evangelista, M.M.; Pereira, M.P.; Sussel, F.R.; Romagosa, E. Environmental manipulation on *Astyanax altiparanae* out-of-season spawning. In: *Aquaculture 2015 Conference, 2015, Montpellier. Anais Aquaculture 2015 Conference, 2015*.
- FishBase, World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (11/2018).
- Flores, A.; Wiff, R.; Ganas, K.; Marshall, C.T., 2019. Accuracy of gonadosomatic index in maturity classification and estimation of maturity ogive. *Fisheries Research*, 210: 50–62.
- Garutti, V.; Britski, HA.; 1997. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae), com mancha umeral horizontalmente ovalada, da Bacia do Rio Guaporé, Amazônia. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 40: 217-229.
- Gomes, A.D.; Tolussi, C.E.; Ribeiro, C.S.; Honji, R.M.; Moreira, R.G. 2015. The role of ovarian steroids in reproductive plasticity in *Hoplias malabaricus* (Teleostei: Characiformes: Erythrinidae) in tropical reservoirs with different degrees of pollution. *General and Comparative Endocrinology*, 222: 1-10.
- Gomes, C.C.; Costa, F.G.; Borella, M.I., 2013. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). *Micron*, 52 (53): 33-38.
- Gonçalves, L.U.; Parisi, G.; Bonelli, A.; Sussel, F.R.; Viegas, E.M.M. 2014. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) broodstock. *Aquaculture Research*, 45 (2): 195–203.

- Hainfellner, P.; Souza, T.G.; Moreira, R.M.; Nakaghi, L.S.O.; Batlouni, S.R. 2012. Gonadal steroids levels and vitellogenesis in the formation of oocytes in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, 10: 601-612.
- Harvey, R.M.; Carolsfeld, J. 1993. Induced breeding in tropical fish culture. International Development Research Centre. Ottawa, Canada. 144p.
- Honji, R.M.; Mello, P.H.; Araújo, B.C.; Rodrigues-Filho, J.A.; Hilsdorf, A.W.S.; Moreira, R.G. 2011. Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): Implications for the conservation of this species. *Neotropical Ichthyology*, 9 (2): 363-370.
- Honji, R.M.; Narcizo, A.M.; Borella, M.I.; Romagosa, E.; Moreira, R.G. 2009. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 109–123.
- Jesus, L.W.O.; Bogerd, J.; Vieceli, F.M.; Branco, G.S.; Camargo, M.P.; Cassel, M.; Moreira, R.G.; Yan, C.Y.I.; Borella, M.I. 2017. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: Molecular characterization, spatiotemporal expression and their possible role on female reproductive dysfunction in captivity. *General and Comparative Endocrinology*, 15 (246): 150-163
- Kagawa, H.; Gen, K.; Tanaka, H. 2003. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. *Biology of Reproduction*, 68: 1562–1568.
- Kagawa, H.; Kasuga, Y.; Adachi, J.; Nishi, A.; Hashimoto, H.; Imaizumi, H.; Kaji, S. 2009. Effects of continuous administration of human chorionic gonadotropin, salmon pituitary extract, and gonadotropin-releasing hormone using osmotic pumps on induction of sexual maturation in male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 296: 117–122.

- Kanemaru, T.; Nakamura, M.; Murata, R.; Kuroki, K.; Horie, H.; Uchida, K.; Senthilkumaran, B.; Kagawa, K. 2012. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture*, 358: 85-91.
- Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E.L.; Gómez, A.; Lareyre, J.J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 412–437.
- LIRA, L. G.; Kuradomi R.Y.; de Souza, T.G.; BATLOUNI, S.R. 2018. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. *Boletim do Instituto de pesca*, 44: 1-10.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method *Methods*, 25: 402–408.
- Lowe-McConnell, R.H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. 1.ed. São Paulo: EDUSP.
- Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 367–389.
- Luckenbach, J.A.; Lliev, D.B.; Goetz, F.W.; Swanson, P.; 2008. Identification of differentially expressed ovarian genes during primary and secondary oocyte growth in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6: 2–16.
- Luckenbach, J.A.; Yamamoto, Y.; Guzmán, J.M.; Swanson, P. 2013. Identification of ovarian genes regulated by follicle-stimulating hormone (Fsh) in vitro during early secondary oocyte growth in coho salmon. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 366: 38–52.
- Melamed, P.; Rosenfeld, H.; Elizur, A. Yaron, Z. 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119C: 325–338.

- Migaud, H.; Davie, A.; Taylor, J.F. 2010. Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *Journal of Fish Biology*, 76: 27- 68.
- Miranda, M.O.T., Ribeiro, L.P., 1997. Características Zootécnicas do Surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. In: MIRANDA, M.O.T. (Org.), Surubim. IBAMA, Belo Horizonte, p. 43–56.
- Mylonas, C. C.; Fatira, E.; Karkut, P.; Papadaki, M.; Sigelaki, I.; Duncand, N. J. 2015. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity III. Comparison between GnRHa implants and injections on spawning kinetics and egg/larval performance parameters. *Aquaculture*, 448: 44–53.
- Mylonas, C.C.; Zohar, Y. 2001. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture*, 202: 205– 220.
- Nagahama, Y.; Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth Differentiation*, 1: 195-219.
- Nakamura, I.; Kusakabe, M.; Young, G. 2003. Regulation of steroidogenic enzyme mRNAs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian follicles in vitro. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 355–356.
- Parreira, W. S. P. Corticosteroids as inductor of ovulation in *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) during artificial reproduction. 84f. Dissertação (Mestrado) em Ciências - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia, USP, 2015.
- Porto-Foresti, F.; Castilho-Almeida, R. B.; Senhorini, J. A.; Foresti, F. 2010. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldisserotto, B. and Gomes, L.C. Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil. B. G. Baldisserotto, L.C. Santa Maria RS Brasil, Editora UFSM. p.101-115.
- Reading, B.J.; Sullivan, C.V.; Schilling, J. 2017. Vitellogenesis in Fishes. Elsevier Inc.
- Resende, E.K.; Catella, A.C.; Nascimento, F.L.; Palmeira, S.S.; Pereira, R.A.C.; Lima, M.S.; Almeida, V.L.L. 1995. Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado

- (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil, Corumbá, MS EMBRAPA CPAP. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2, 75p.
- Rocha, M.J.; Rocha, E. 2006. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes an overview. In: Reinecke, M.; Zaccane, G.; Kappor, B.G. (eds) Fish Endocrinology. Science Publishers, Enfield, pp: 570–624.
- Scholz, S.; Kordes, C.; Hamann, J.; Gutzeit, H.O. 2004. Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): comparison of gene expression and protein levels. Marine Environmental Research, 57: 235–244.
- Simpson, A.C., 1951. The fecundity of the plaice. Fish Investigation, 5: 1–27.
- Swanson, P.; Dickey, J. T.; Campbell, B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. Fish Physiology and Biochemistry, 28: 53–59,
- Tolussi, C.E.; Gomes, A.D.O.; Kumar, A.; Ribeiro, C.S.; Lo Nostro, F.L.; Bain, P.A.; Souza, G.B.; Cuña, R.; Honji, R.M.; Moreira, R.G. 2018. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). Ecotoxicology and Environmental Safety, 14: 926–934.
- Tsutsui, K.; Saigoh, E.; Ukena, K.; Teranishi, H.; Fujisawa, Y.; Kikuchi, M.; Ishii, S.; Sharp, P.J. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. Biochemical and Biophysical Research Communications, 275: 661–667.
- Tsutsui, K.; Ubuka, T.; Bentley, G. E.; Kriegsfeld, L. J. 2012. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Discovery, progress and prospect. General and Comparative Endocrinology, 177 (3): 305-314.
- Tyler, C.R.; Sumpter, J.P.; Kawauchi, H.; Swanson, P. 1991. Involvement of Gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic Oocytes of the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, 84: 292-299.

- Vazzoler, A.E.A.M., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e Prática*, first ed. Nupelia, Maringá.
- West, G., 1990. Methods of Assessing Ovarian development in Fishes: a Review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 41: 199– 222.
- Young, G.; Todo, T.; Kusakabe, M.; Kobayashi, T.; Nagahama, Y. 2002. 3β -hydroxysteroid dehydrogenase gene: sites of expression in trout gonads and cAMP-dependent regulation. In: Norberg, B.; Kjesbu, O.S.; Taranger, G.L.; Andersson, E.; Stefansson, S.O. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish*. Institute of Marine Research, Bergen, p. 202.
- Zohar Y.; Mylonas, C.C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99–136.
- Zohar, Y.; Muñoz-Cueto, J.; Elizur, A.; Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 438-455.