UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Protocolos de indução hormonal com extrato bruto de hipófises de carpa e o perfil da prostaglandina F2α durante a maturação final e ovulação em *Astyanax altiparanae*

Daniel Guimarães Figueiredo Ariki

Jaboticabal, São Paulo
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Protocolos de indução hormonal com extrato bruto de hipófises de carpa e o perfil da prostaglandina F2α durante a maturação final e ovulação em *Astyanax altiparanae*

Daniel Guimarães Figueiredo Ariki

Orientador: 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.

Jaboticabal, São Paulo
2019

Figueiredo-Ariki, Daniel Guimarães
F475p Protocolos de indução hormonal com extrato bruto de hipófises de carpa e o perfil da prostaglandina F2α durante a maturação final e ovulação em Astyanax altiparanae / Daniel Guimarães Figueiredo Ariki. – – Jaboticabal, 2019
ii, 47 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2019
Orientador: Sergio Ricardo Batlouni
Banca examinadora: Eduardo Antônio Sanches, Fernanda Ferreira Loureiro de Almeida, Renata Guimarães Moreira Whitton, Regiane Cristina da Silva
Bibliografia

1. Lambari. 2. Hipofisação. 3. Indução hormonal. 4. Prostaglandina. 5. PGF2α. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 636.3.034

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

*EM TEMPO: onde se lê "Indução hormonal com doses únicas e fracionadas de EBHC e o perfil da PGF2α durante a maturação final e ovulação em Astyanax altiparanae", leia-se "Protocolos de indução hormonal com extrato bruto de hipófises de carpa e o perfil da prostaglandina F2α durante a maturação final e ovulação em Astyanax altiparanae".

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

*

TÍTULO DA TESE: Indução hormonal com doses únicas e fracionadas de EBHC e o perfil da PGF2 durante a maturação final e ovulação em *Astyanax altiparanae*

AUTOR: DANIEL GUIMARÃES FIGUEIREDO ARIKI
ORIENTADOR: SERGIO RICARDO BATLOUNI

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

Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI
Laboratório de Reprodução de Peixes / Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP

Prof. Dr. EDUARDO ANTONIO SANCHES
Engenharia de Pesca / Câmpus Experimental de Registro - Unesp

Profa. Dra. FERNANDA FERREIRA LOUREIRO DE ALMEIDA
EMBRAPA, Manaus-AM

Profa. Dra. RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON
Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências / Universidade de São Paulo - SP

Dra. REGIANE CRISTINA DA SILVA
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP

Jaboticabal, 25 de fevereiro de 2019

SUMÁRIO

Agradecimentos 1

Apoio financeiro 1

RESUMO 2

ABSTRACT 3

1. INTRODUÇÃO 4

2. OBJETIVOS 9

3. MATERIAL E MÉTODOS 9

3.1. Manutenção dos animais 9

3.3. Aprovação do uso de animais em pesquisa 11

3.3. Amostragens 11

3.4. Experimentos 12

3.3.1. Experimento 1 12

3.3.2. Experimento 2 14

3.3.3. Experimento 3 15

3.5. Análise de desempenho e parâmetros reprodutivos 16

3.5.1. Taxas de fertilização e eclosão 16

3.5.2. Índice Gonadossomático (IGS) 17

3.5.3. Indicadores de desempenho reprodutivo 17

3.6. Análise de concentração plasmática de PGF2α 18

3.7. Histologia e morfologia ovariana 18

3.7.1. Descrição das estruturas ovarianas 18

3.7.2. Análise da frequência de estruturas ovarianas 19

3.8. Análise Estatística 20

4. RESULTADOS 21

4.1. Desempenho e parâmetros reprodutivos 21
4.1.1. IGS 21
4.1.2. Experimento 1 22
4.1.3. Experimento 2 23
4.1.4. Experimento 3 24
4.2. Concentração plasmática de PGF2α 25
4.2.1. Experimento 1 25
4.2.2. Experimento 2 26
4.2.3. Experimento 3 27
4.3. Histologia e morfologia ovariana 28
4.3.1. Identificação e descrição das estruturas ovarianas 28
4.3.2. Frequências de estruturas ovarianas do experimento 1 30
4.3.3. Frequências de estruturas ovarianas do experimento 2 32
4.3.4. Frequências de estruturas ovarianas do experimento 3 34
4.3.5. Correlações 36
5. DISCUSSÃO 37
6. CONCLUSÃO 41
7. REFERÊNCIAS 42

Agradecimentos

Deus, família e amigos.

Apoio financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão - FUNEP - Projetos 1.1061 e 1.1059.
Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP.

RESUMO

Considerando as inconsistentes informações acerca dos protocolos de indução hormonal do *Astyanax altiparanae* em cativeiro, o principal objetivo deste estudo foi comparar o desempenho reprodutivo utilizando ou não extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). Avaliamos também o efeito de diferentes doses de EBHC sobre o desempenho reprodutivo em dois distintos lotes de peixes. Em todos os experimentos, avaliamos se um eventual ganho no desempenho reprodutivo estaria associado com alterações na morfologia dos ovários e/ou com concentrações séricas de prostaglandina F2α (PGF2α). Nos experimentos 1 (lote capturado na natureza) e 2 (lote nascido em cativeiro), aplicamos 3, 6 e 9 $mg.kg^{-1}$ de EBHC (T1, T2 e T3 respectivamente), e um grupo controle (C). No experimento 3 (mesmo lote do experimento 2), comparamos o desempenho reprodutivo com dose única e fracionada (10% e 90% da dose total, com intervalo de 12 horas entre as doses) de EBHC, sendo 6 $mg.kg^{-1}$ em dose única (H1) ou fracionada (H2) e seus respectivos controles (C1 e C2). Nos experimentos 1 e 2 o desempenho reprodutivo foi similar entre os grupos, porém os grupos T2 e T3 apresentaram elevações de PGF2α no momento da ovulação, além de variações significativas nas frequências de estruturas ovarianas, que indicam aumento da ovulação e /ou a maturação final. No experimento 3, a dose fracionada de 6 $mg.kg^{-1}$ de EBHC causou um aumento na proporção de réplicas com desova e consequentemente, no volume total de desova e no número total de embriões viáveis. Esta dose também causou um aumento na frequência de complexos pós ovulatórios e no nível de PGF2α no momento da desova. Concluímos que a indução hormonal pode potencializar a desova do lambari. Os reprodutores dos diferentes lotes apresentaram um padrão similar de resposta ao tratamento com EBHC. O fracionamento da dose de EBHC propiciou melhor desempenho que a dose única, o qual, porém, só ficou evidente em análises histológicas e de concentrações de PGF2α. Portanto, recomendamos o uso da dose fracionada de 6 $mg.kg^{-1}$ de EBHC para indução hormonal desta espécie em cativeiro, usando as condições aqui aplicadas.

Palavras chave: lambari, hipofisação, indução hormonal, prostaglandina, PGF2α.

ABSTRACT

Considering the inconsistent information about the hormonal induction protocols of *Astyanax altiparanae* in captivity, the main objective of this study was to compare the reproductive performance with or without crude carp pituitary extract (EBHC). We also evaluated the effect of different doses of EBHC on the reproductive performance of two distinct broodstocks. In all experiments, we evaluated whether a possible gain in reproductive performance would be associated with changes in ovarian morphology and / or with serum prostaglandin F2α (PGF2α) concentrations. In the experiments 1 (wild caught) and 2 (born in captivity), we applied 3, 6 and 9 $mg.kg^{-1}$ EBHC (T1, T2 and T3 respectively), and one control group (C). In the experiment 3 (same broodstock as in experiment 2), we compared reproductive performance with single and fractional doses (10% e 90% of the total, with 12 hours of interval between doses) of EBHC, being: 6 $mg.kg^{-1}$ in single dose (H1) or fractional (H2) and their respective controls (C1 and C2). In the experiments 1 and 2 the reproductive performance was similar between groups, but groups T2 and T3 presented elevations of PGF2α at the time of ovulation, besides significant variations in the frequencies of ovarian structures, which indicates increase in ovulation and / or final maturation. In the experiment 3, the fractional dose of 6 $mg.kg^{-1}$ EBHC caused an increase in the proportion of replicates with spawn events and consequently, in the total volume of eggs and the absolute number of viable embryos. This dose also caused an increase in the frequency of post ovulatory complexes and the level of PGF2α at spawning time. We conclude that the hormonal induction can potentialize the spawning of lambari. Different broodstock presented a similar pattern of response to EBHC treatment. The fractioning of the EBHC doses gave better performance than the single dose, but, however, was only evident in histological and PGF2α concentrations analyzes. Therefore, we recommend the use of the fractional dose of 6 $mg.kg^{-1}$ of EBHC for hormonal induction of this species in captivity, using the conditions applied herein.

Key words: lambari, hyphophysation, hormonal induction, prostaglandin, PGF2α.

1. INTRODUÇÃO

Os estudos de indução à reprodução realizados na década de 30, principalmente por VON IHERING & AZEVEDO (1936) foram de grande importância para a aquicultura atual. Na ausência de estudos deste tipo, produtores estariam limitados à captura de larvas e alevinos para criação em cativeiro. Além disso, pesquisas em diversas áreas incluindo melhoramento genético, biotecnologias relacionadas à reprodução e embriologia de espécies que necessitam da indução hormonal não seriam possíveis. Da mesma forma, áreas como nutrição e fisiologia seriam afetadas pela falta de lotes homogêneos de peixes. A reprodução induzida de peixes é um dos pilares da aquicultura moderna pois proporciona o fornecimento de larvas e alevinos, essenciais para o desenvolvimento de pesquisas aplicadas e consequentemente, da própria atividade.

Em teleósteos, a reprodução é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (ANKLEY & GRAY, 2013; Bobe & Labbé, 2010; TOKARZ *et al.,* 2015; LUBZENS et al., 2010; MYLONAS et al., 2010; NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008; SCHULZ et al., 2010; ZOHAR et al., 2010), no qual estímulos endógenos e ambientais promovem a liberação de substâncias como o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo, o qual, por sua vez, estimula a liberação das gonadotrofinas *follicle-stimulating hormone* e *luteinizing hormone* (FSH e LH, respectivamente) na hipófise. Estes estímulos podem ainda causar a produção de dopamina, um pequeno neurotransmissor, que em muitas espécies inibe a síntese e a liberação das gonadotrofinas hipofisárias e do próprio GnRH (ZOHAR *et al.*, 2010). Existem ainda as kisspeptinas, peptídeos estão relacionadas (pelo menos em mamíferos) com a modulação da reprodução através da mediação entre os estímulos ambientais e os sinais metabólicos para o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (ZOHAR *et al.*, 2010). Além disso, existem outros fatores podem influenciar funções gonadotrópicas como o neuropeptídeo Y, neurotransmissor GABA (*Gamma-aminobutyric acid*) e o hormônio inibidor das gonadotrofinas (GnIH) (ZOHAR *et al.*, 2010).

O FSH e o LH estimulam o desenvolvimento gonadal (LEVAVI-SIVAN *et al.,* 2010; LUBZENS *et al.,* 2010; NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008; SCHULZ *et al.*,

2010; TAKAHASHI *et al.,* 2016; TOKARZ *et al.,* 2015). Em fêmeas, o FSH está relacionado principalmente com a vitelogênese, regulando a síntese de *17β-estradiol* (E_2), a partir da testosterona (TOKARZ *et al.,* 2015). O E_2 atua no fígado estimulando a produção de vitelogeninas (CLELLAND & PENG, 2009; LUBZENS *et al.,* 2010; NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008; READING *et al.*, 2017; TOKARZ *et al.,* 2015) que são transportadas pela corrente sanguínea até os folículos em crescimento, ligando-se a receptores de vitelogenina e transportados para o interior dos oócitos por endocitose, onde são clivadas em proteínas que são armazenadas na forma de grânulos de vitelo (READING *et al.*, 2017). Posteriormente, o vitelo oriundo deste processo, irá nutrir o embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento (KOHLI *et al.*, 2005).

O LH está relacionado com a produção de *17α-hidroxiprogesterone* (17α-OHP) e a modulação de uma enzima que catalisa a conversão do 17α-OHP em *17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one* (17α,20β-DHP) (LUBZENS *et al.,* 2010; NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008), hormônio fundamental para a maturação final dos oócitos (LUBZENS *et al*., 2010) e ovulação (LUBZENS *et al*., 2010; KOHLI *et al.*, 2005; NAGAHAMA, 2007; TAKAHASHI *et al.,* 2016; TOKARZ *et al.*, 2015). O LH também parece estar relacionado com a síntese de prostaglandinas em *Danio rerio* (LISTER & VAN DER KRAAK, 2008; 2009) e em *Salvelinus fontinalis* (CRESPO *et al.,* 2015). O 17α,20β-DHP se liga a receptores de membrana (THOMAS 2012; TOKARZ *et al.*, 2015), desencadeando sinalizações intracelulares e estimulando portanto todos os processos associados com a maturação final dos oócitos, como a quebra da vesícula germinativa (GVBD), formação do fuso, condensação cromossômica até a formação do primeiro corpúsculo polar (TOKARZ *et al.*, 2015). A ovulação é o processo de liberação dos oócitos dos folículos para a cavidade ovariana (JALABERT, 2005).

As prostaglandinas são eicosanoides cujo precursor é o ácido araquidônico (AA), que é clivado da membrana celular fosfolipídica pela enzima fosfolipase A2 e então oxidado, formando a prostaglandina PGH2, que é rapidamente convertida em outras substâncias como as prostaglandinas PGE2 e PGF2α (TAKAHASHI *et al.*, 2018). Tratamentos com AA *in vitro* em *Perca fluviatilis* induziram a produção de 17α,20β-DHP, também conhecido como MIS (*maturation inducing steroid*) na maioria

dos teleósteos, assim como a produção de PGE2 e PGF2α (HENROTTE *et al*., 2011). Além disso, tratamentos com MIS estimularam a síntese de PG nos folículos ovarianos de *Danio rerio* (KNIGHT & VAN DER KRAAK, 2015; LISTER & VAN DER KRAAK, 2008; LISTER & VAN DER KRAAK, 2009;) e *Anguilla japonica* (KAGAWA *et al.,* 2003). Por estas razões, a interação entre o MIS e as prostaglandinas, principalmente PGE2 e PGF2α que estão relacionadas com a ovulação em peixes (CRISCUOLO-URBINATI *et al*., 2012; KAGAWA *et al.,* 2003; KNIGHT & VAN DER KRAAK, 2015; LUBZENS *et al.,* 2010; NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008; SORBERA *et al.,* 2001; TAKAHASHI *et al.,* 2013; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TOKARZ *et al.,* 2015) precisa ser mais estudada. As prostaglandinas também estão relacionadas com a esteroidogênese, indução da maturação folicular, indução do comportamento de oviposição, estimulação da produção de testosterona nas gônadas, além de desencadear o comportamento reprodutivo dos machos e a sincronização deste comportamento entre machos e fêmeas (TAKAHASHI *et al.,* 2017; TOKARZ *et al.,* 2015; YABUKI *et al.*, 2016).

Apesar de estarem fortemente associadas com o processo de ovulação em peixes (revisado por: TAKAHASHI *et al.*, 2017), as prostaglandinas ainda permanecem pouco estudadas em espécies neotropicais, pois maior parte dos estudos usam peixes modelo ou abordagens *in vitro* em espécies de regiões temperadas, para as quais essa associação direta já foi demonstrada. Em *Piaractus mesopotamicus* (pacu), a uso da PGF2α exógena concomitante à hipofisação aumentou significativamente o número de fêmeas que desovaram em comparação ao grupo controle, sem prejudicar as taxas de fertilização e eclosão, além de diminuir o número de oócitos com GVBD retidos nos ovários após a desova (CRISCUOLO-URBINATI *et al.,* 2012; KURADOMI & BATLOUNI, 2018). Estes trabalhos são importantes e permitem explorar características de cada indivíduo, através de múltiplas coletas de sangue no mesmo animal, como por exemplo o *P. mesopotamicus* que é uma espécie de grande porte. Porém, esta espécie apresenta desova total, ou seja, ocorre somente uma vez ao ano, o que limita a possibilidade de múltiplos experimentos. Diante disso, o uso de tantos animais em idade reprodutiva desta espécie pode representar um entrave em pesquisas futuras.

Assim, surge a necessidade de encontrar uma espécie alternativa e mais facilmente disponível, como é o caso do *Astyanax altiparanae.*

Ademais, além de ser uma espécie de pequeno porte, altamente prolifera e ter fertilização externa sem cuidado parental (aspectos típicos de peixes migradores com desova total) (GARUTTI & BRITSKI, 2000; SUZUKI *et al.,* 2005), o *A. altiparanae* apresenta particularidades em relação a estas espécies, tais como: pode desovar mais de uma vez dentro da mesma estação reprodutiva, maturidade sexual relativamente precoce (em cerca de 4 meses) e apresenta dimorfismo sexual (PORTO-FORESTI *et al.,* 2001). Devido a estas características, pode ser reproduzida durante todo o ano em condições controladas (BRAMBILA-SOUZA *et al.,* 2019; LIRA *et al.*, 2018). É uma espécie reofílica bastante promissora para a aquicultura e que também tem sido utilizada como modelo em estudos em diferentes áreas do conhecimento (CASSEL*, et. al.,* 2017; CASSEL*, et. al.,* 2017b; CHEHADE *et al.,* 2015; COSTA *et al*., 2014; FELIZARDO, *et al.,* 2012; GOMES *et al.,* 2013; JESUS *et al.,* 2017; SIQUEIRA-SILVA *et al.,* 2015; YASUI *et al.,* 2015).

Em geral, espécies reofílicas necessitam dos estímulos ambientais durante a migração para se reproduzir em condições naturais e quando contidas em tanques em cativeiro estes estímulos são insuficientes para causar a maturação final, o que resulta em falha na reprodução (MYLONAS & ZOHAR, 2007). Desta forma, técnicas como a indução hormonal são necessárias para realizar a reprodução desta espécie em cativeiro (MYLONAS & ZOHAR, 2007). A indução hormonal consiste na aplicação de uma ou mais substâncias químicas para induzir uma resposta fisiológica como aconteceria em condições naturais (HONJI *et al*., 2011). Entre estas substâncias, a mais utilizada para peixes migradores tropicais é o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) (ZANIBONI-FILHO & WEINGARTNER, 2007). Também conhecida como hipofisação, a aplicação deste extrato foi desenvolvida na década de trinta (VON IHERING & AZEVEDO, 1936) e ainda é amplamente utilizada nos dias atuais. Consiste em aplicar um extrato de hipófises de animais doadores, em idade reprodutiva (que supostamente contém LH em sua composição), o qual irá promover a maturação final dos oócitos (NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008; MYLONAS *et al.,* 2010) pelos mecanismos já descritos anteriormente.

Na maioria das espécies reofílicas utilizadas na aquicultura são empregados protocolos de indução hormonal baseados nos primeiros estudos com hipofisação (CRISCUOLO-URBINATI *et al.*, 2012; FIGUEIREDO-ARIKI *et al.*, 2018; HAINFELLNER *et al.*, 2012; HONJI *et al.*, 2011; LIRA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018). Da mesma forma em *A. altiparanae*, a indução hormonal é realizada utilizando diferentes doses únicas de EBHC tais como 3mg.kg^{-1} (BEM *et al.* 2012; NASCIMENTO *et al.,* 2017; YASUI *et al.,* 2014), 6 mg.kg^{-1} (FELIZARDO *et al.,* 2012; LIRA *et al.,* 2018; SATO *et al.,* 2006) ou 5 mg.kg^{-1} em dose fracionada (ORBOLATO *et al.*, 2006). Apesar da hipofisação ser uma prática comum e apresentar resultados positivos, faltam informações sobre a dosagem, método de aplicação, tempo de aplicação e manejo em geral para cada espécie, já que muitas vezes protocolos de indução semelhantes ou idênticos são utilizados para diferentes espécies. Além disso, diferentemente da maioria das espécies reofílicas utilizadas na aquicultura, o *A. altiparanae* pode ocasionalmente desovar em cativeiro sem a necessidade de indução hormonal (CHEHADE *et al.,* 2015). Destacamos ainda, a grande discrepância e inconsistência de informações científicas e técnicas a cerca da necessidade de indução hormonal da espécie, mais especificamente sobre dúvidas existentes sobre a eficiência dos métodos de indução hormonal frente a desova espontânea; como também pelas razões desconhecidas de ser uma das poucas espécies induzidas hormonalmente com uma única dose hormonal de EBHC.

2. OBJETIVOS

Devido às inconsistências supracitadas, os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar o desempenho reprodutivo de *Astyanax altiparanae* com ou sem indução hormonal utilizando EBHC e se este desempenho é intensificado com o uso de diferentes doses deste extrato;
2. Avaliar se lotes de reprodutores desta espécie capturados na natureza e nascidos em cativeiro apresentam padrões diferentes de respostas;
3. Avaliar o efeito do fracionamento da dose de 6mg $mg.kg^{-1}$ de EBHC no desempenho reprodutivo de animais nascidos em cativeiro;
4. Verificar a relação entre o desempenho reprodutivo e as concentrações plasmáticas de PGF2α, substância essa sabidamente conhecida como potencial indutor de ovulação em peixes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção dos animais

Os três experimentos foram realizados no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) no Laboratório de Reprodução de peixes nativos, entre outubro de 2016 e janeiro de 2018.

Foram utilizados dois lotes distintos de exemplares adultos de *A. altiparanae* mantidos em viveiros escavados de 300 m^3 (20 x 10 x 1,5 m), com renovação de água constante, sem aeração artificial. O primeiro lote foi formado por animais selvagens capturados na natureza durante um projeto de reintrodução adequada de peixes da empresa Duke Energy International em parceria com o CAUNESP, com a finalidade de serem domesticados para a reprodução em cativeiro e posterior soltura dos alevinos na bacia do rio Sapucaí Mirim (interior de São Paulo), onde se encontram as pequenas centrais hidrelétricas da empresa. Este lote de animais selvagens foi mantido em cativeiro por cerca de 2 anos. O outro lote de *A.*

altiparanae foi formado por animais nascidos em cativeiro e mantidos durante cerca de 1 ano até atingir um tamanho favorável para as amostragens durante os experimentos.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia até a saciedade aparente com ração comercial extrusada para peixes onívoros (Nutripiscis® 2,6 mm) com a seguinte composição: proteína bruta (mín.) 36%, umidade (máx.) 12%, extrato etéreo (mín.) 7%, matéria fibrosa (máx.) 5%, matéria mineral (máx.) 14%, vitaminas e micronutrientes 22%, aminoácidos (lisina, metionina e treonina) 4%.

A concentração de oxigênio dissolvido (OD), temperatura (T), pH e condutividade foram aferidos quinzenalmente utilizando oxímetro YSI 550a (Yellow Spring Incorporation); um pHmetro K39-0014P (Kasvi) e um condutivímetro HI98311 (Hanna Instruments). As médias dos valores relativos às variáveis físicas e químicas da água, aferidas ao longo de um ano entre dois experimentos consecutivos, foram: OD=6,80±2,26 $mg.L^{-1}$; T=25,34±2,95 °C, pH=6,83±0,26; condutividade=83,43±28,67 $\mu S.cm^{-1}$.

Para a realização dos experimentos, os animais foram capturados com uma rede de arrasto e separados por sexo ainda nos viveiros, utilizando critérios morfológicos (dimorfismo sexual) durante a fase reprodutiva: os machos apresentam espículas na nadadeira anal e o corpo mais delgado em relação às fêmeas, as quais, por sua vez, apresentam o ventre abaulado e papila urogenital proeminente e avermelhada. Após a sexagem, os animais foram transportados para o laboratório em sacos plásticos de transporte com um terço do volume de água e dois terços de oxigênio. No laboratório, machos e fêmeas foram mantidos separados em caixas d'água de 750 L em um sistema fechado de recirculação, com aquecedores automáticos(faixa de temperatura programada de 26 a 28°C, média de 26,8±0,4°C), filtro de partículas, filtro biológico e filtro ultravioleta. Durante este período (aproximadamente 22 horas) os animais não foram alimentados. Os valores relativos às variáveis físicas e químicas da água do laboratório foram aferidos durante os períodos experimentais e as médias ± desvio padrão foram inclusas na metodologia de cada experimento.

3.3. Aprovação do uso de animais em pesquisa

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Câmpus de Jaboticabal-SP (protocolo nº 013920/17), de acordo com os preceitos de lei e normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.3. Amostragens

Em cada amostragem foram aferidos dados biométricos (massa total, comprimento total e massa dos ovários) e coletado material biológico (sangue e ovários). Para isto, os animais foram anestesiados por imersão em uma solução de 100 mg.L-1 de Benzocaína (P-aminobenzoato de Etila, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). O sangue foi coletado através da punção da artéria caudal utilizando agulha (13mm x 0,38 mm) e seringa (1 mL) descartável heparinizada (heparina sódica, 5000 UI.mL^{-1}) e então tomadas as medidas de massa e comprimento corporal utilizando uma balança digital (com acurácia de duas casas decimais) e ictiômetro respectivamente. Cada amostra de sangue foi subdividida em 2 criotubos de 2 mL, um deles previamente adicionado indometacin (17,9 mg de indometacin diluído em 5 ml de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na concentração de 10 µM, como inibidor da síntese de prostaglandinas. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos descartáveis até o final da amostragem, e então centrifugadas à 3000 rpm x 10 minutos à 4°C. O plasma obtido foi coletado com micropipetas e transferidos para criotubos que foram armazenados em freezer -80°C para posterior análise da concentração plasmática de PGF2α. Os animais foram então eutanasiados através da secção da coluna cervical e decapitação com uma lâmina de bisturi para a posterior incisão ventral e retirada das vísceras. Foi aferida a massa dos ovários intactos para posterior cálculo do Índice gonadossomático (IGS) e também foram feitas secções transversais de partes dos ovários e fixadas em solução de Karnovski (2,5% glutaraldeído e 4%

paraformaldeído em tampão fosfato 0,05M, pH 7,3), destinadas à preparação de lâminas histológicas.

3.4. Experimentos

O EBHC em todos os experimentos foi aplicado utilizando solução fisiológica (NaCl 0,9%) como veículo, na proporção de 100 µL para cada 10 g de massa animal. Os grupos controle receberam somente a solução fisiológica, na mesma proporção (exceto o controle negativo do experimento 3, no qual não foi aplicada nenhuma substância)

Em todos os experimentos foi utilizado o método de desova "semi-natural", no qual os machos e fêmeas permaneceram caixas plásticas (unidade experimental) semi-transparentes de 10 L com entrada de água corrente pela tampa e uma saída de água com uma bolsa (feita com uma rede de malha 0,5 mm) para coleta de ovos na parte externa da caixa. Estas caixas ou unidades experimentais estavam conectadas à um sistema de recirculação de água, com parâmetros físicos e químicos controlados.

Alíquotas de 10 ml de ovos de cada réplica que apresentou desova foram colocadas individualmente em incubadoras cônicas de 6,5 L feitas de acrílico, para a posterior amostragem de ovos e determinação das taxas de fertilização e eclosão de cada réplica.

3.3.1. Experimento 1

Foram utilizados 86 fêmeas (42,4±7,1 g) e 100 machos (23,2±10,5 g) do primeiro lote de *A. altiparanae* (selvagens), distribuídos em 20 caixas (4 fêmeas e 5 machos por caixa). Os parâmetros físicos e químicos da água foram mensurados no início e durante o experimento às 08h10min e 23h:00min do dia 0, cujas médias foram: T=26,71±0,55 °C; pH=6,70±0,10; OD=7,20±0,90 $mg.L^{-1}$ e condutividade=95,30±8,70 $\mu S.cm^{-1}$.

O experimento durou cerca de nove horas e neste período foram realizadas três amostragens (detalhes no item "*3.3. Amostragens*"), de acordo com a Figura 1. Simultaneamente à indução hormonal, foi realizada uma amostragem inicial de 6 fêmeas não induzidas (amostragem "0h", às 23h50min do dia 0) como referência inicial dos tratamentos. Em um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições, os grupos C (controle salino), T1 (3 $mg.Kg^{-1}$ EBHC), T2 (6 $mg.Kg^{-1}$ EBHC) e T3 (9 $mg.Kg^{-1}$ EBHC) foram induzidos às 23h30min (do dia 0) com as respectivas doses de EBHC ou solução fisiológica. Simultaneamente, os machos de todos os grupos foram induzidos com 6 $mg.Kg^{-1}$ EBHC. Aproximadamente três horas após a indução (02h55min do dia 1) foi realizada uma amostragem intermediária (amostragem "3h"), de uma fêmea por réplica, totalizando 5 por tratamento. Após esta amostragem intermediária, as bolsas para coleta foram observadas em intervalos de 30 minutos para verificar a ocorrência de desova. Uma fêmea de cada réplica foi coletada na amostragem "6h", momento definido como “horário da desova”. Esta amostragem foi assim definida por meio de observações obtidas em projetos pilotos onde se observou um pico na atividade de posturas (em experimentos realizados nas mesmas condições no Laboratório de Reprodução de Peixes do CAUNESP). Foram registradas desovas durante cerca de três horas (5h20min à 8h27min do dia 1). Quando foram encontrados ovos nas bolsas, estes foram coletados após 30 minutos em uma proveta para aferir o volume da desova por réplica. Posteriormente, uma alíquota de 10 ml de ovos de cada réplica foi colocada em uma incubadora cônicas de acrílico de 6,5 L. Uma amostra de 1 mL de ovos de cada grupo foi coletada para quantificar a relação de número de ovos por mL. Após cerca de três e nove horas a partir do horário de desova, uma amostra (≅ 300 ovos) foi coletada de cada incubadora para estimar a taxa de fertilização e eclosão, respectivamente.

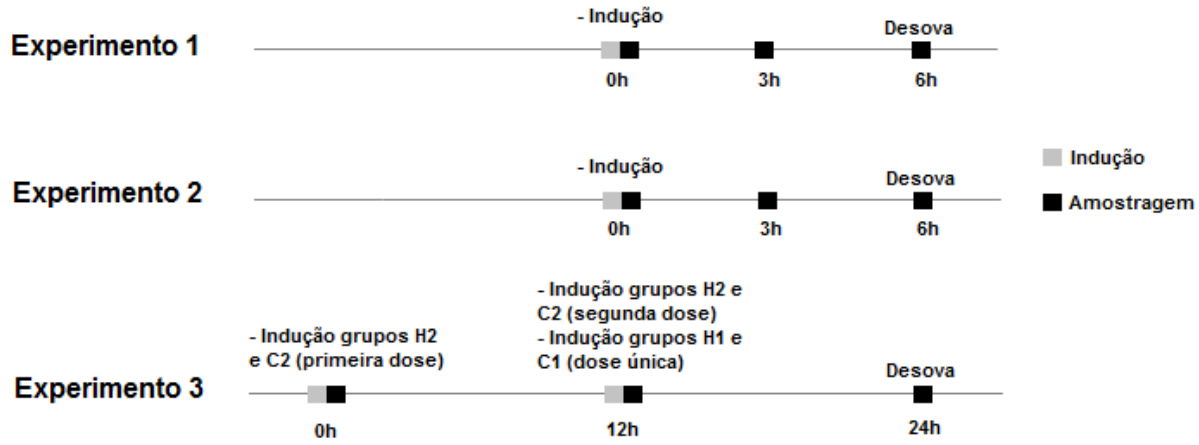


Figura 1. Diagrama dos tempos de indução hormonal e amostragens experimentos 1, 2 e 3. H1: dose única de 6 mg.kg-1 de EBHC; C1: dose única de solução fisiológica; H2: dose de 6mg.kg-1 EBHC fracionadas em 10% (primeira dose) e 90% (segunda dose); C2: duas doses de solução fisiológica.

3.3.2. Experimento 2

Com o objetivo de avaliar diferenças nas respostas frente a indução hormonal usando diferentes lotes (possível razão de discrepâncias nos resultados entre diversos artigos publicados e relatos de produtores e pesquisadores), um novo experimento foi realizado, utilizando o segundo lote de animais (com 1 ano de idade, nascidos em cativeiro). Foram utilizadas 106 fêmeas (14,98±3,56 g) e 100 machos (7,61±2,21 g), distribuídos em 20 caixas plásticas (5 fêmeas e 5 machos por caixa). Os parâmetros físicos e químicos da água mensurados no início e durante o experimento às 11h30min e 23h:30min do dia 0, cujas médias foram: T=26,40±0,35 °C; pH=6,66±0,10; OD=8,45±0,04 mg.L^{-1} e condutividade=45,50±7,20 µS.cm^{-1}.

O experimento durou cerca de nove horas e neste período foram realizadas três amostragens (detalhes no item "*3.3. Amostragens*"), de acordo com a Figura 1. Simultaneamente à indução hormonal, foi realizada uma amostragem inicial de 6 fêmeas não induzidas (amostragem "0h", às 23h50min do dia 0) como referência inicial dos tratamentos. Em um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições, os grupos C (controle salino), T1 (3 mg.Kg^{-1} EBHC), T2 (6 mg.Kg^{-1} EBHC) e T3 (9 mg.Kg^{-1} EBHC) foram induzidos às 23h05min (do dia 0) com as respectivas doses de EBHC ou solução fisiológica. Os machos de todos os

grupos foram induzidos com 6 mg.Kg^{-1} EBHC, simultaneamente durante a divisão dos grupos. Aproximadamente três horas após a indução (02h20min do dia 1) foi realizada uma amostragem intermediária (amostragem "3h"), de uma fêmea por réplica, totalizando 5 por tratamento. A partir de seis horas após a indução hormonal, as réplicas foram monitoradas em intervalos de 30 minutos para verificar a ocorrência de desovas, e caso positivo, foi aguardado mais 30 minutos e então coletadas todas as fêmeas da réplica (amostragem "6h"). Foram registradas desovas durante cerca de quatro horas (6h26min à 11h10min). Foi aferido o volume das desovas por réplica, e em seguida uma alíquota de 10 ml de ovos por réplica foi colocada em uma incubadora cônica de acrílico de 6,5 L. Após cerca de três e nove horas à partir do horário de desova, uma amostra (≅ 300 ovos) foi coletada de cada incubadora para estimar a taxa de fertilização e eclosão, respectivamente.

3.3.3. Experimento 3

Para avaliar o fracionamento da dose sobre o desempenho reprodutivo, realizamos um terceiro experimento, utilizando animais do segundo lote (o mesmo do experimento 2). Os parâmetros físicos e químicos da água mensurados no início e durante o experimento às 12h30min e 22h:10min do dia 0, cujas médias foram: T=27,2±0,30 °C; pH=7,0±0,10; OD=8,10±1,20 mg.L^{-1} e condutividade=75,4±4,4 µS.cm^{-1}).

Em um delineamento experimental com 5 tratamentos e 4 repetições, 106 fêmeas (22,40±6,60 g) e 200 machos (10,20±4,40 g) foram distribuídos em 20 caixas plásticas (5 fêmeas e 8 machos por caixa) da seguinte forma: dois grupos que receberam dose única de 6 mg.kg^{-1} de EBHC (H1) ou solução fisiológica (C1); dois grupos que receberam doses de 6mg.kg^{-1} EBHC fracionadas em 10% (primeira dose - 0,6 mg.kg^{-1} de EBHC) e 90% (segunda dose - 5,4 mg.kg^{-1} de EBHC) ou duas doses de solução fisiológica (H2 e C2, respectivamente) com 12 horas de intervalo entre as doses; e um grupo no qual não foi aplicado nenhum indutor ou solução fisiológica (CN). Todos os machos receberam uma dose de 6 mg.kg^{-1} no momento da segunda dose das fêmeas (00h10min do dia 1) e então foram adicionados às caixas.

Foram realizadas três amostragens (detalhes no item "*3.3. Amostragens*"), de acordo com a Figura 1. Foi realizada uma amostragem inicial de 6 fêmeas não induzidas (nomeada amostragem "0h") no momento da primeira dose hormonal (12h05min do dia 0). Doze horas após a primeira dose dos grupos H2 e C2, foram aplicadas a segunda dose nestes grupos, assim como a dose única nos grupos H1 e C1 (00h10min do dia 1) e em seguida foi realizada a amostragem de um animal por réplica (amostragem "12h"). A partir de seis horas (e a cada 30 minutos), as bolsas para coleta foram observadas e, caso encontrados ovos nas bolsas, estes foram coletados após 30 minutos, foi aferido o volume da desova e então foi alicotado 10 mL de desova e colocada em uma incubadora cônica de acrílico de 6,5L. Foram registradas desovas durante cerca de quatro horas (6h49min à 10h51min do dia 1). Finalmente, após cerca de 12 horas (12h15min do dia 1) à partir da segunda dose, todas as fêmeas foram coletadas (amostragem "24h"), sendo que as caixas que apresentaram desova foram priorizadas na mesma ordem na amostragem. Após cerca de três e nove horas à partir do horário de desova, uma amostra (≅ 300 ovos) foi coletada de cada incubadora para estimar a taxa de fertilização e eclosão, respectivamente.

3.5. Análise de desempenho e parâmetros reprodutivos

3.5.1. Taxas de fertilização e eclosão

Três horas ou aproximadamente 80 Unidades térmicas acumuladas (UTA) após a desova, uma amostra (≅ 300 ovos) foi coletada de cada incubadora, para estimar a taxa de fertilização. As amostras foram coletadas neste tempo, pois é aproximadamente o momento do desenvolvimento embrionário que ocorre o fechamento do blastóporo, que é um bom indicativo da qualidade dos gametas e da fertilização (Godinho, 2007). Em um estereomicroscópio LEICA M50 (LEICA Microsystems, Wetzlar, Alemanha) estes ovos foram contados e classificados pela presença ou ausência de desenvolvimento embrionário (bons e gorados,

respectivamente). Nove horas (≅ 230 UTA) após a desova, foram coletadas amostras para a estimativa da taxa de eclosão, quando foi observado movimento da cauda dos embriões antes da eclosão (o que assumimos ser um embrião viável que iria eclodir em breve). A temperatura média foi de 26,8±0,4°C.
O cálculo para estimativa das taxas foi feito da seguinte forma:

$$\text{Taxa de fertilização ou eclosão} = \frac{Número\ de\ ovos\ viáveis}{Número\ total\ de\ ovos}\ x\ 100$$

3.5.2. Índice Gonadossomático (IGS)

O IGS foi calculado para testar associações entre variáveis relacionadas à desova. Nos animais desovados, a massa dos ovários é representada pela massa do ovário remanescente após a desova, cujo valor é menor em relação ao valor de animais não desovados. Esse índice expressa em porcentagem a massa dos ovários em relação a massa do animal e foi calculado da seguinte forma:

$$\text{IGS} = \frac{Massa\ dos\ ovários\ (g)}{Massa\ do\ indivíduo\ (g)}\ x\ 100$$

3.5.3. Indicadores de desempenho reprodutivo

Com a finalidade de investigar qual tratamento apresentou o melhor resultado geral (principalmente em relação à taxa de desova e maior produção de larvas), estipulamos alguns parâmetros para classificar os resultados entre os tratamentos testados. Foi calculada a frequência de réplicas que apresentaram desova por grupo experimental, assim como a frequência de fêmeas desovadas por réplica em cada grupo experimental e o volume total de desova por grupo experimental. Um segundo critério foi considerado, com relação a fecundidade, onde foram calculados os valores médios de volume de desova por réplica, considerando somente as réplicas nas quais foram observadas desovas. Isso para excluir o impacto da presença de réplicas onde nenhuma fêmea desovou e permitindo confrontar as duas formas de

análise. Finalmente, foi calculado o número de embriões viáveis, fixando o valor de 720 ovos.mL^{-1} (valor médio obtido pela contagem das amostras de 1mL de ovos neste estudo), considerando o volume inicial de ovos nas incubadoras (10 mL) e a taxa de eclosão, por meio da seguinte fórmula:

$$Nº\ de\ Embriões\ viáveis = nº\ inicial\ de\ ovos\ por\ incubadora\ x\ taxa\ de\ eclosão$$

3.6. Análise de concentração plasmática de PGF2α

As concentrações plasmáticas de PGF2α foram obtidas através do método Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) utilizando kits comerciais (Prostaglandin F2α EIA *kit* Cat. Nº516011, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As amostras de plasma utilizadas para a leitura foram àquelas nas quais foi adicionado 10 µM de indometacin (17,9 mg de indometacin em 5 ml de etanol absoluto) como inibidor da síntese de prostaglandinas, seguindo instrução do fabricante.

A leitura das placas de ELISA foi feita com absorbância à 405 nm em um leitor de placas Epoch2 (Bio teK Instruments, Inc., Highland Park, Winooski, USA). Todas as amostras foram lidas em duplicata. Para a validação do kits foram realizados os testes intra e inter-ensaio, respeitando o limite coeficiente de variação (CV) de 20%.

3.7. Histologia e morfologia ovariana

3.7.1. Descrição das estruturas ovarianas

As amostras previamente fixadas em Karnovski foram utilizadas para a confecção de lâminas histológicas. Os fragmentos de ovários de cada animal foram desidratados em soluções de etanol 70% a 100% e incluídos em glicol metacrilato utilizando o kit de historesina Tecnovit H7100 (Electron Microscopy Sciences,

Hatfield, PA, USA). Os blocos foram seccionados e foram obtidos cortes não seriados de 3 µm de espessura em um Micrótomo RM 2245 (LEICA Biosystems, Wetzlar, Alemanha), dispostos em lâminas e coradas com hematoxilina-eosina. Em um microscópio DM4000B acoplado a uma câmera de captura de imagens (LEICA Microsystems, Wetzlar, Alemanha) foram obtidas fotomicrografias de 3 diferentes campos por lâmina (objetiva de 5x). Como a análise tem a finalidade de expor as mudanças que ocorrem durante a reprodução induzida, a classificação das estruturas ovarianas foi feita de forma geral e objetiva. Os tipos de estruturas observadas foram classificados de acordo com a descrição de QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.* (2011) recentemente aplicada por CASSEL *et al.* (2017) em *A. altiparanae*, seguindo a nomenclatura proposta por BROWN-PETERSON *et al.* (2011). Foram contabilizadas as seguintes estruturas: oócito em crescimento primário (PG); oócito alvéolo-cortical (AC), oócito em crescimento secundário ou vitelogênico incompleto (SG), oócito *full-grown* ou vitelogênico completo (FG), oócito após a quebra da vesícula germinativa (GVBD), complexo pós-ovulatório (POC), oócito atrésico (AT) e tecido intersticial (TI).

3.7.2. Análise da frequência de estruturas ovarianas

Com base nos tipos de estruturas anteriormente mencionadas foi possível acessar o estágio de maturação dos animais nos diferentes tempos de amostragem, assim como determinar se uma fêmea desovou (presença de POCs), se não respondeu ao tratamento (maior frequência de oócitos FG) ou se respondeu ao tratamento mas não desovou (maior frequência de oócitos com GVBD). Para isso, foi realizada a análise de densidade de volume.

A análise de densidade de volume foi realizada pela metodologia de CRISCUOLO-URBINATI *et al*. (2012) com modificações. Um *grid* de 352 pontos ou intersecções foi aplicado sobre cada uma das 3 imagens obtidas anteriormente utilizando o freeware ImageJ (v 1.46r, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) e então contabilizados como pontos válidos as intersecções entre as linhas do grid que se cruzavam sobre um dos tipos de estruturas. As intersecções em pontos inválidos (em branco) ou em estruturas irreconhecíveis devido ao corte ou a

disposição nas bordas da imagem foram classificadas como artefatos, e não foram inclusas no cálculo das frequências. O cálculo para cada animal foi realizado da seguinte forma (onde X corresponde ao tipo de estrutura calculada):

$$\text{Frequência (X)} = \frac{Soma\ dos\ pontos\ válidos\ X\ dos\ três\ campos}{Soma\ total\ dos\ pontos\ dos\ três\ campos}\ x\ 100$$

3.8. Análise Estatística

O delineamento dos experimentos foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições (Experimentos 1 e 2) ou com 5 tratamentos e 4 repetições (Experimento 3). Os testes estatísticos foram realizados utilizando os softwares R (Freeware disponível em: https://www.r-project.org/) ou SAS (Statistical Analysis Software v.9.4). Os dados foram testados para os pressupostos de normalidade e homocedasticidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Todos os testes foram realizados com o nível de significância α=0,05.

Entre os parâmetros reprodutivos, alguns (proporção de réplicas com desovas, número de fêmeas desovadas nas réplicas onde ocorreu desova e volume total da desova) não foram analisados estatisticamente, pois são características referentes ao grupo, que não possuem uma média. Os demais parâmetros reprodutivos (volume médio de desova por réplica com desovas, taxa de fertilização, taxa de eclosão e número de embriões viáveis) foram comparados pelos testes One-Way ANOVA seguido do teste Tukey HSD (honestly significant difference) para as variáveis paramétricas ou Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas, e pelo teste t de Student no caso de algumas comparações entre duas variáveis paramétricas, todos representados por média±DP (desvio padrão).

Para os níveis plasmáticos de PGF2α e frequência de tipos de estruturas ovarianas ao longo do tempo de amostragem foi utilizado o teste ANOVA para medidas repetidas e os dados foram representados por média±EP (erro padrão).

Os níveis plasmáticos de PGF2α e o IGS foram correlacionados com as frequências das estruturas ovarianas de interesse durante a reprodução induzida

(FG, GVBD e POC) utilizado o teste de correlação de postos de Spearman. No evento de correlação, considera-se a correlação negligível com valores de ρ (rô) de 0,0 a 0,10, fraca de 0,10 a 0,39, moderada de 0,40 a 0,69, forte de 0,70 a 0,89 e muito forte de 0,90 a 1,0, de acordo com um método convencional de interpretação de coeficientes de correlação (Schober *et al*., 2018).

4. RESULTADOS

4.1. Desempenho e parâmetros reprodutivos

4.1.1. IGS

O IGS inicial médio, assim como o IGS médio das fêmeas desovadas e não desovadas ao final dos experimentos estão descritos na Tabela 1. O IGS médio das fêmeas desovadas foi significativamente inferior ao IGS inicial em todos os experimentos ($p<0,05$).

Tabela 1: Índice gonadossomático (média ± desvio padrão) inicial e final de fêmeas desovadas e não desovadas de *Astyanax altiparanae*.

Índice Gonadossomático			
	IGS inicial	IGS das fêmeas desovadas	IGS das fêmeas não nesovadas
Experimento 1	21,22±3,08 [b]	7,45±4,28 [a]	19,66±3,05 [b]
Experimento 2	22,46±0,65 [b]	10,77±6,15 [a]	24,07±3,70 [b]
Experimento 3	20,08±4,79 [b]	6,65±0,98 [a]	20,05±3,33 [b]

Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre o IGS médio das fêmeas de *A. altiparanae.*

4.1.2. Experimento 1

O período de latência médio do experimento foi de 181±31 UTA. Não foi possível comparar o grupo C com os demais tratamentos, pois o mesmo apresentou somente uma réplica com uma fêmea desovada. Entre os grupos T1, T2 e T3 houve uma crescente proporção de réplicas que apresentaram desova (e consequentemente um maior volume total de desova) diretamente proporcional à dose de EBHC dos tratamentos, porém não houve diferença significativa entre a média de desova por réplica com desovas, taxa de fertilização, eclosão e número de embriões viáveis (p>0.05)(Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros reprodutivos de *Astyanax altiparanae* induzidos com diferentes níveis de extrato bruto de hipófise de carpas (Experimento 1).

Parâmetros reprodutivos	Grupo Experimental			
	Controle Salino (C)	**3 mg.kg-1 EBHC (T1)**	**6 mg.kg^{-1} EBHC (T2)**	**9 mg.kg^{-1} EBHC (T3)**
Proporção de réplicas com desovas	1/5	2/5	3/5	5/5
Fêmeas desovadas nas unidades onde ocorreu desova	1	1-1	1-1-1	2-3-1-1-2
Volume total de desova (mL)	54,0	74,5	119,0	210,5
Volume médio de desova por réplica com desovas (mL)	54,0	37,3±18,0	39,7±26,5	42,1±33,7
Taxa de fertilização (%)	94,0	48,0±39,0	71,0±31,0	48,0±20,0
Taxa de eclosão (%)	78,0	44,0±36,0	76,0±20,0	39,0±24,0
Embriões viáveis	30.326,4	14.124,0±15.409,0	22.344,0±19.972,0	16.472,0±18.154,0

Os valores médios estão representados como média±DP.

4.1.3. Experimento 2

O período de latência médio do experimento foi de 205±19 UTA. Não foi observado aumento na proporção de réplicas que apresentaram desova e não houve diferença significativa entre a média de desova por réplica com desovas, taxa de fertilização, eclosão e número de embriões viáveis dos tratamentos C, T2 e T3 (p>0,05)(Tabela 3). O grupo T1 não foi analisado com os demais, pois apresentou somente uma réplica com uma fêmea desovada.

Tabela 3: Parâmetros reprodutivos de *Astyanax altiparanae* induzidos com diferentes níveis de extrato bruto de hipófise de carpas (Experimento 2).

Parâmetros reprodutivos	**Grupo Experimental**			
	Controle Salino (C)	**3 mg.kg-1 EBHC (T1)**	**6 mg.kg^{-1} EBHC (T2)**	**9 mg.kg^{-1} EBHC (T3)**
Proporção de réplicas com desovas	2/ 5	1/5	2/5	2/5
Fêmeas desovadas nas unidades onde ocorreu desova	1-1	1	1-1	1-1-1
Volume total de desova (mL)	39,0	2,0	36,0	45,0
Volume médio de desova por réplica com desovas (mL)	19,5±10,6	2	18,0±10,6	21,5±12,0
Taxa de fertilização (%)	45,0±6,0	0	51,0±1,0	63,0±1,0
Taxa de eclosão (%)	37,0±5,0	0	30,0±2,0	39,0±1,0
Embriões viáveis	2787,4±1971,0	0	5184,0±2160,0	7507,8±4197,7

Os valores médios estão representados como média±DP.

4.1.4. Experimento 3

O período de latência médio do experimento foi de 174±35 UTA. Não foi possível comparar os grupos H1 e C1 com os demais pois estes não apresentaram desova. Da mesma forma, o grupo CN apresentou apenas uma réplica na qual ocorreu desova. Os grupos H2 e C2 apresentaram respectivamente cinco e duas réplicas nas quais ocorreram desova, porém não houve diferença significativa entre a média de desova por réplica com desovas, taxa de fertilização, eclosão e número de embriões viáveis ($p>0.05$)(Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros reprodutivos de *Astyanax altiparanae* induzidos com doses únicas e fracionadas de extrato bruto de hipófise de carpas (Experimento 3).

Parâmetros reprodutivos	Grupo Experimental				
	H1	C1	H2	C2	CN
Proporção de réplicas com desovas	0/5	0/5	5/5	2/5	1/5
Fêmeas desovadas nas unidades onde ocorreu desova	-	-	1-2-1-3-1	2-1	1
Volume total de desova (mL)	-	-	217	92	49
Volume médio de desova por réplica com desovas (mL)	-	-	37,85±29,6	30,7±10,3	49
Taxa de fertilização (%)	-	-	66,0±3,0	51,0±2,0	78
Taxa de eclosão (%)	-	-	48,0±3,0	45,0±3,0	72
Embriões viáveis	-	-	23.359,7±13.479,7	8894,4±5751,2	8280

H1: 6 $mg.kg^{-1}$ de EBHC, dose única; C1: solução fisiológica, dose única; H2: 6 $mg.kg^{-1}$ fracionado em duas doses (10% e 90% da dose total, com intervalo de 12 horas); C2: solução fisiológica fracionada em duas doses; CN: controle negativo. Os valores médios estão representados como média±DP.

4.2. Concentração plasmática de PGF2α

4.2.1. Experimento 1

A concentração basal média de PGF2α foi de 0,33±0,06 ng.ml^{-1} e o coeficiente de variação amostral foi de 7,06±5,43%. Ao longo do tempo, somente o grupo T3 teve um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de PGF2α na amostragem do momento da desova ("6h") ($p<0,05$)(Fig. 2). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos na amostragem inicial ("0h") e intermediária ("3h") ($p>0,05$). Na amostragem do momento da desova ("6h"), os grupos C, T1 e T2 foram semelhantes entre si ($p>0,05$), T3 foi significativamente superior ao C e T1 ($p<0,05$) porém semelhante à T2 ($p>0,05$).

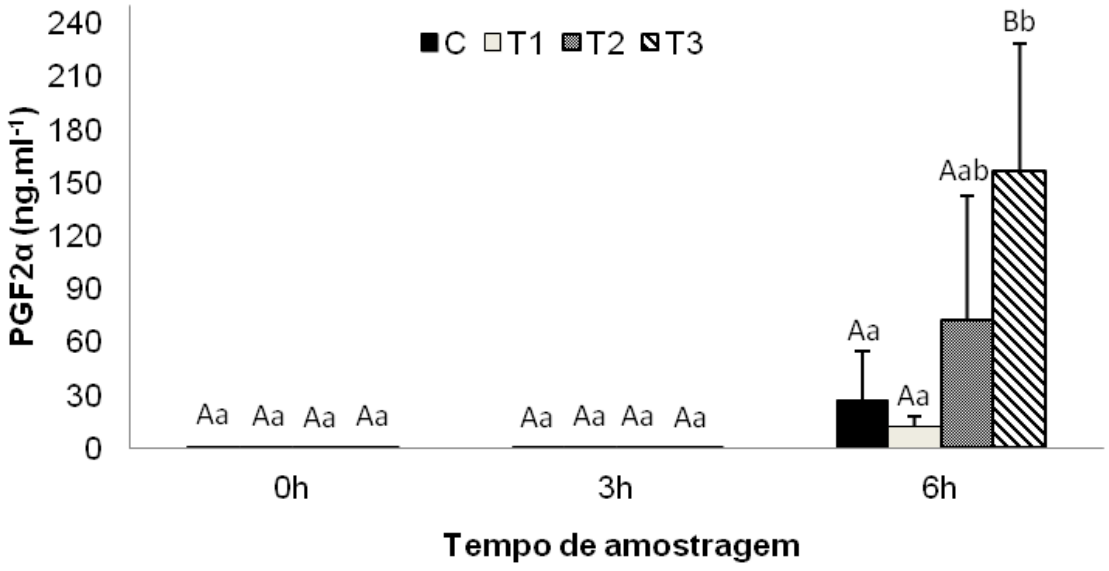


Figura 2: Níveis plasmáticos de prostaglandina F2α e erro padrão dos tratamentos ao longo dos tempos de amostragem em *A. altiparanae* no experimento 1. C: Controle Salino; T1: 3 mg.kg^{-1} EBHC (Extrato Bruto de Hipófises de Carpa); T2: 6 mg.kg^{-1} EBHC; T3: 9 mg.kg^{-1} EBHC. Letras maiúsculas representam diferenças ao longo do tempo. Letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos no mesmo tempo de amostragem.

4.2.2. Experimento 2

A concentração basal média observada foi de 0,33±0,05 ng.ml^{-1} e o coeficiente de variação amostral foi de 8,86±6,58%. Ao longo do tempo, somente o grupo T2 teve um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de PGF2α na amostragem do momento da desova ("6h") ($p<0,05$) (Fig. 3). Não houve diferenças significativas entre tratamentos em nenhum dos tempos de amostragem ($p>0,05$).

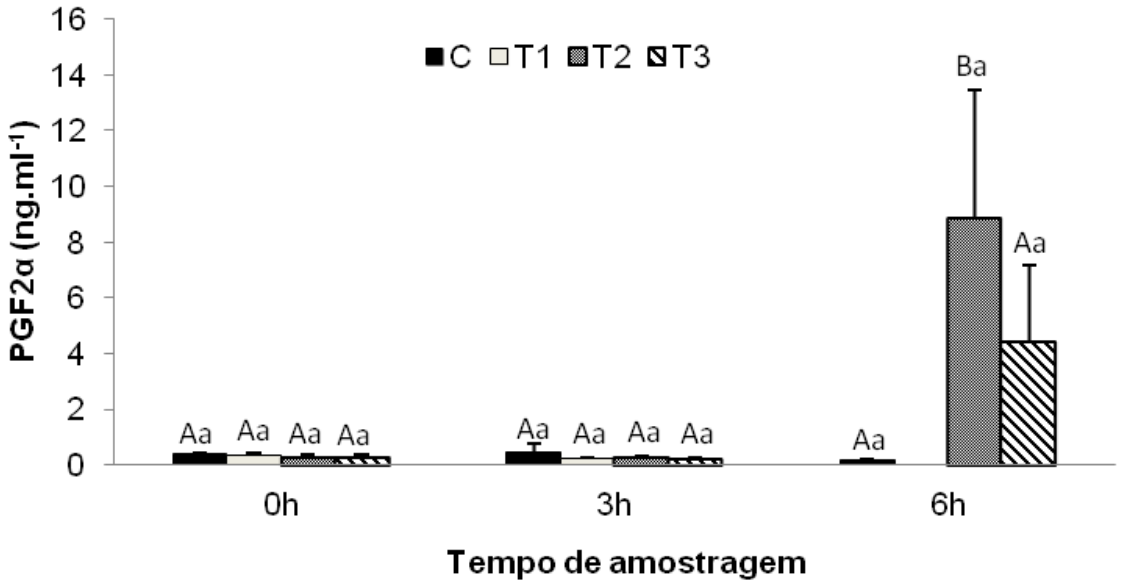


Figura 3: Níveis plasmáticos de prostaglandina F2α e erro padrão dos tratamentos ao longo dos tempos de amostragem em *A. altiparanae* no experimento 2. C: Controle Salino; T1: 3 mg.kg^{-1} EBHC (Extrato Bruto de Hipófises de Carpa); T2: 6 mg.kg^{-1} EBHC; T3: 9 mg.kg^{-1} EBHC. Letras maiúsculas representam diferenças ao longo do tempo. Letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos no mesmo tempo de amostragem.

4.2.3. Experimento 3

A concentração basal média observada foi de 0,34±0,19 ng.ml^{-1} e o coeficiente de variação amostral foi de 6,95±6,31% (Fig. 4). Ao longo do tempo, somente o grupo H2 teve um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de PGF2α na amostragem do momento da desova ("24h") ($p<0,05$). Não houve diferença significativa nas concentrações plasmáticas de PGF2α de todos os grupos nos tempos de amostragem inicial e intermediário ("0" e "12h") ($p>0,05$). Somente no momento da desova ("24h"), o grupo H2 apresentou um aumento significativo em relação aos demais grupos ($p<0,05$).

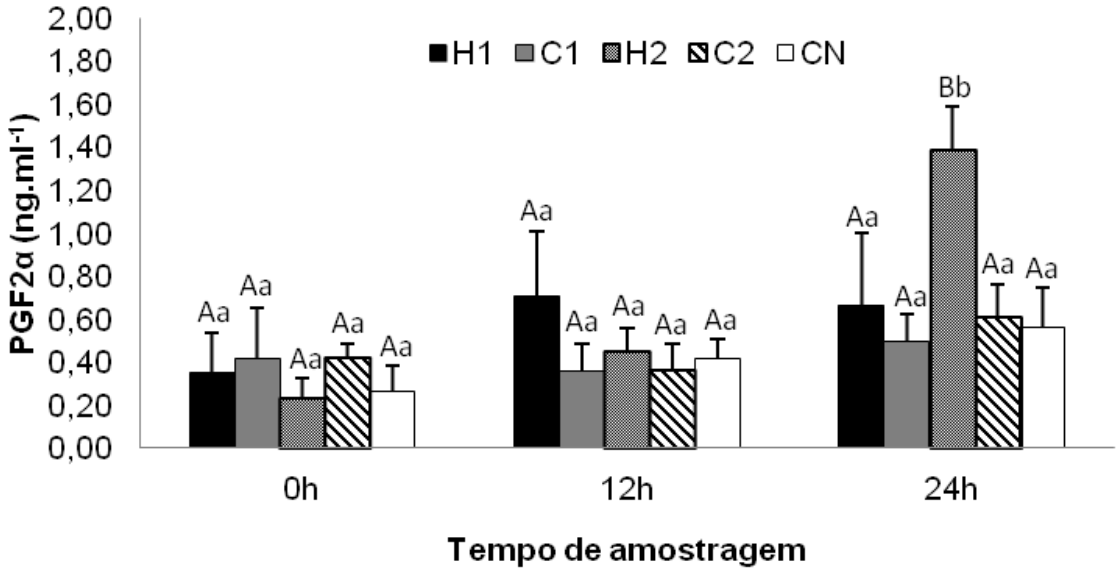


Figura 4: Níveis plasmáticos de prostaglandina F2α e erro padrão dos tratamentos ao longo dos tempos de amostragem em *A. altiparanae* no experimento 3. H1: 6 mg.kg-^{1} de EBHC (Extrato Bruto de Hipófises de Carpa), dose única; C1: solução fisiológica, dose única; H2: 6 mg.kg-^{1} fracionado em duas doses (10% e 90% da dose total, com intervalo de 12 horas); C2: solução fisiológica fracionada em duas doses; CN: controle negativo. Letras maiúsculas representam diferenças ao longo do tempo. Letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos no mesmo tempo de amostragem.

4.3. Histologia e morfologia ovariana

4.3.1. Identificação e descrição das estruturas ovarianas

Foram observadas todas as estruturas ovarianas mencionadas na metodologia (Fig. 5), apresentadas em uma breve descrição de suas estruturas (Tabela 5). Entre os oócitos FG foram observados alguns com o núcleo central, outros com núcleo excêntrico (estágio de maturação que precede o GVBD), porém a maioria destes oócitos não apresentavam núcleo visível, portanto todos foram classificados como FG.

Tabela 5: Descrição das estruturas ovarianas observadas em diferentes estágios de maturação em *A. altiparanae.*

Estruturas ovarianas	Descrição
PG	Oócito no estágio inicial da fase de pré vitelogênese, núcleo condensado com nucléolos periféricos e citoplasma basofílico.
CA	Oócito em transição para a fase de vitelogênese, porém aumenta de tamanho e apresenta alvéolos corticais no citoplasma.
SG	Oócito na fase de vitelogênese, grânulos de vitelo começam a ser incorporados ao citoplasma.
FG	Oócito após o final da vitelogênese, citoplasma totalmente preenchido por grânulos de vitelo, o núcleo pode estar na posição central ou excêntrica.
GVBD	Oócito na fase de coriogênese, quando ocorre a quebra da vesícula germinativa e formação do polo animal na região micropilar.
POC	Estrutura remanescente no ovário após a liberação do oócito do folículo ovariano para o lúmen ovariano, constituída da membrana basal e teca.
AT	Oócito em processo de reabsorção, com formato irregular e conteúdo desorganizado.
TI	Tecido conjuntivo ou de sustentação do ovário, com células grandes e altamente vascularizado.

PG: oócito em crescimento primário; CA: oócito alvéolo-cortical; SG: oócito em crescimento secundário; FG: oócito *full-grown*; GVBD: oócito após a quebra da vesícula germinativa; POC: complexo pós-ovulatório; AT: oócito atrésico; TI: tecido intersticial. BROWN-PETERSON et al. (2011)

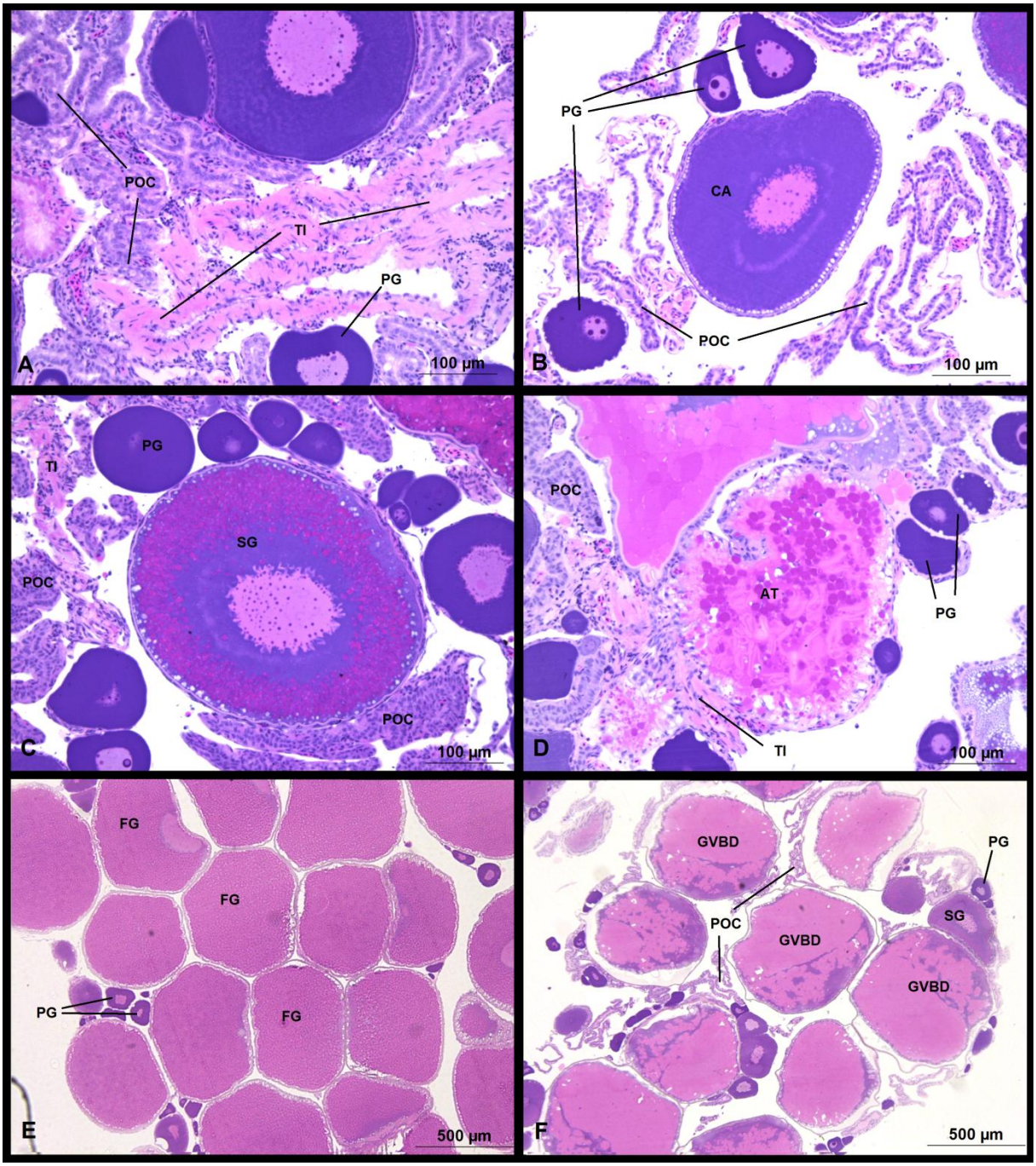


Figura 5: Tipos de estruturas e estágios de desenvolvimento folicular encontradas nos ovários de *A. altiparanae.* durante a reprodução induzida com EBHC. PG: oócito em crescimento primário; CA: oócito alvéolo-cortical; SG: oócito em crescimento secundário; FG: oócito *full-grown*; GVBD: oócito após a quebra da vesícula germinativa; POC: complexo pós-ovulatório; AT: oócito atrésico; TI: tecido intersticial.

4.3.2. Frequências de estruturas ovarianas do experimento 1

Os parâmetros avaliados nas amostragems "0h" e "3h" (Fig. 6A, B) foram similares entre os grupos ($p>0,05$).

Na amostragem "6h" (Fig. 7C), as frequências de TI, PG, CA, AT e POC foram semelhantes entre os tratamentos ($p>0,05$); a frequência de SG de T2 foi superior àquelas de C, T1 e T3 ($p<0,05$) que foram semelhantes entre si ($p>0,05$); a frequência de FG dos grupos T1, T2 e T3 (3, 6 e 9 $mg.Kg^{-1}$ de EBHC, respectivamente) foram semelhantes entre si ($p>0,05$) e diferentes de C ($p<0,05$); a frequência de GVBD de T1 foi superior àquelas de T2 e T3, que por sua vez foram superiores à de C ($p<0,05$).

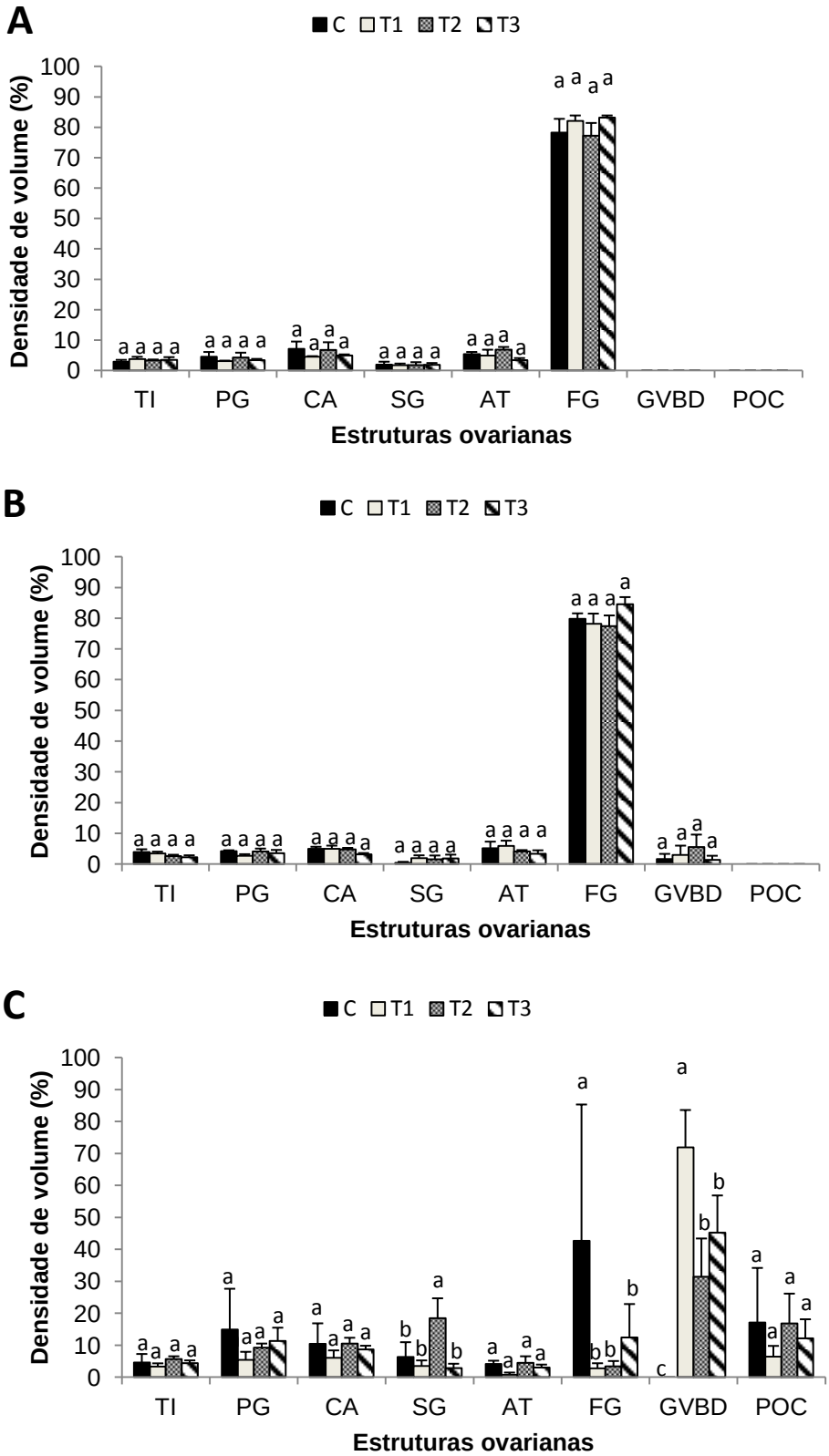


Figura 6: Frequências de tipos de estruturas ovarianas e estágios de desenvolvimento folicular (e erro padrão) nos tempos de amostragem "0h" (A), "3h" (B) e "6h" (C) de *A. altiparanae* do experimento 1. Na legenda, C: Controle Salino;

T1: 3 mg.kg^{-1} EBHC (Extrato Bruto de Hipófises de Carpa); T2: 6 mg.kg^{-1} EBHC; T3: 9 mg.kg^{-1} EBHC. Estruturas ovarianas, PG: oócito em crescimento primário; CA: oócito alvéolo-cortical; SG: oócito em crescimento secundário; FG: oócito *full-grown*; GVBD: oócito após a quebra da vesícula germinativa; POC: complexo pós-ovulatório; AT: oócito atrésico; TI: tecido intersticial. As Letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos.

4.3.3. Frequências de estruturas ovarianas do experimento 2

No experimento 2, não houve diferenças significativas entre os tratamentos na amostragem "0h" ($p>0,05$) (Fig. 7A).

Na amostragem "3h" (Fig. 7B), não houve diferença significativa na frequência de CA, SG e AT e POC entre os tratamentos ($p>0,05$). O grupo T2 apresentou frequências de TI e PG significativamente superiores àquelas de C, T1 e T3 ($p<0,05$); a frequência de FG dos grupos C, T1 e T2 foram semelhantes entre si ($p>0,05$), a frequência de T3 foi superior a C ($p<0,05$) e semelhante à T1 e T2 ($p>0,05$); a frequência de GVBD de T3 foi diferente de C, T1 e T2 ($p<0,05$), que foram semelhantes entre si ($p>0,05$).

Na amostragem "6h" (Fig. 7C), na qual adotamos a estratégia de coletar todas as fêmeas da réplica algum tempo depois de observar desova, o grupo T1 não apresentou resultados por não ter nenhuma réplica com desova. Não houve diferenças significativas. Não houve diferenças significativas entre TI, PG, CA, SG, AT e POC entre os grupos ($p>0,05$). A frequência de FG de C foi semelhante à T3, que por sua vez foi semelhante à T2 ($p>0,05$), mas houve diferença significativa entre C e T2 ($p<0,05$); a frequência de GVBD de T2 foi semelhante a T3 ($p>0,05$), e estas superiores a C ($p<0,05$).

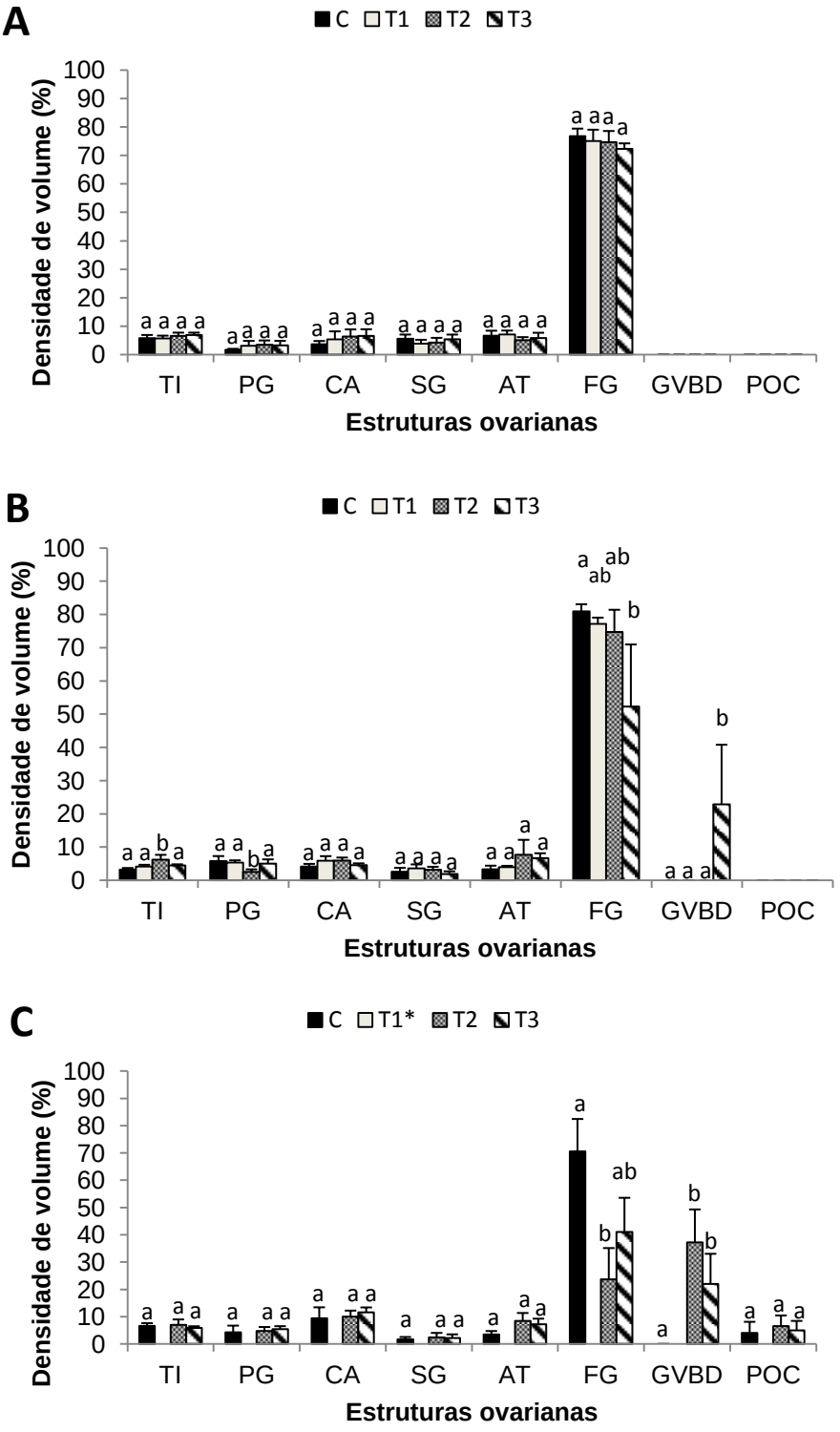


Figura 7: Frequências de tipos de estruturas ovarianas e estágios de desenvolvimento folicular (e erro padrão) nos tempos de amostragem "0h" (A), "3h" (B) e "6h" (C) de *A. altiparanae* do experimento 2. Na legenda, C: Controle Salino; T1: 3 mg.kg^{-1} EBHC (Extrato Bruto de Hipófises de Carpa); T2: 6 mg.kg^{-1} EBHC; T3: 9 mg.kg^{-1} EBHC. Estruturas ovarianas, PG: oócito em crescimento primário; CA: oócito alvéolo-cortical; SG: oócito em crescimento secundário; FG: oócito *full-grown*;

GVBD: oócito após a quebra da vesícula germinativa; POC: complexo pós-ovulatório; AT: oócito atrésico; TI: tecido intersticial. As Letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos. Barras representam o erro padrão. *O grupo T1 não apresentou resultados por não ter nenhuma réplica com desova.

4.3.4. Frequências de estruturas ovarianas do experimento 3

No experimento 3, não houve diferença significativa de CA, SG, AT, FG, GVBD e POC entre os tratamentos na amostragem "0h" ($p>0,05$) (Fig. 8A). Os grupos H1, H2, C2 e CN apresentaram frequências de TI semelhantes entre si ($p>0,05$). O grupo C1 apresentou frequências de TI significativamente superiores àquelas de H1 e C2 ($p<0,05$), porém semelhantes a H2 e CN ($p>0,05$). Os grupos H1, H2, C2 e CN apresentaram frequências de PG semelhantes entre si ($p>0,05$). O grupo H1 apresentou frequências de PG superiores àquelas de H2 e CN ($p<0,05$) e os grupos H1, C1 e C2 apresentaram frequências de PG semelhantes entre si ($p>0,05$).

Na amostragem "12h" (Fig. 8B), houve diferença apenas na frequência de TI do tratamento H1, que foi inferior àquelas de C1, H2, C2 e CN ($p<0,05$), e estas foram semelhantes entre si ($p>0,05$).

Na amostragem "24h" (Fig. 8C), os grupos H1, H2, C1 e C2 apresentaram frequências de TI semelhantes entre si($p>0,05$). O grupo CN apresentou frequência de TI superior à C1 ($p<0,05$) e semelhante à H1, H2 e C2 ($p>0,05$). O grupo H2 apresentou frequências de CA superiores àquelas de H1 e C1 ($p<0,05$) e semelhantes àquelas de C2 e CN ($p>0,05$). Os grupos H1, H2, C2 e CN apresentaram frequências de CA semelhantes entre si ($p>0,05$).

Ainda na amostragem "24h", em relação às frequências de FG, os grupos H1 e H2, apresentaram valores inferiores à C1 ($p<0,05$), porém semelhantes à C2 e CN ($p>0,05$). Os grupos C1, C2 e CN foram semelhantes entre si ($p>0,05$). O grupo H1 apresentou frequência de GVBD superior aos grupos C1, H2, C2 e CN ($p<0,05$), os quais foram semelhantes entre si ($p>0,05$). O grupo H2 apresentou frequências de POC superiores àquelas de H1 e C1($p<0,05$), porém semelhantes à C2 e CN ($p>0,05$).

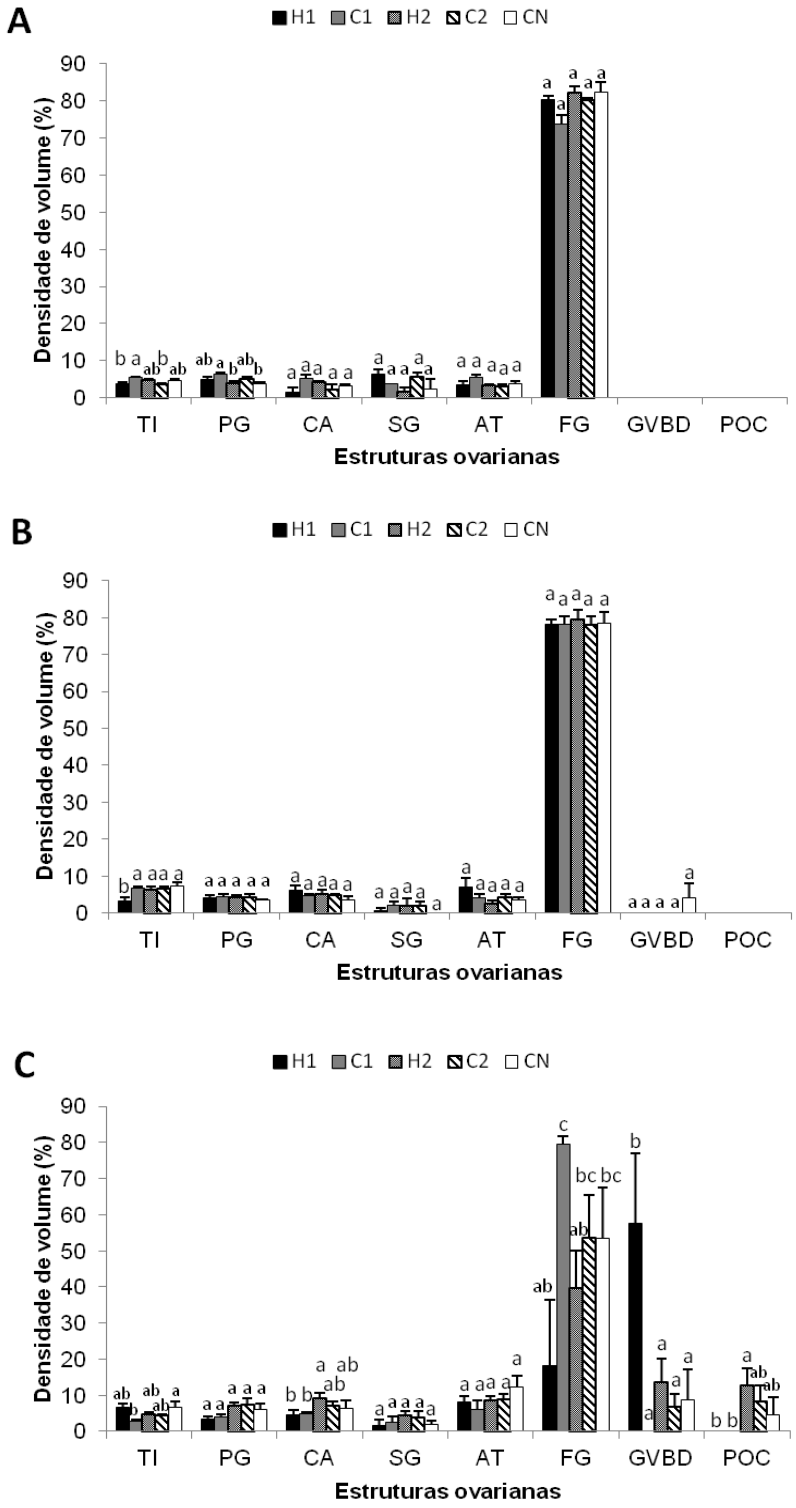


Figura 8: Frequências de tipos de estruturas ovarianas e estágios de desenvolvimento folicular (e erro padrão) nos tempos de amostragem "0h" (A), "3h" (B) e "6h" (C) de *A. altiparanae* do experimento 3. H1: 6 mg.kg-^{1} de EBHC (Extrato Bruto de Hipófises de Carpa), dose única; C1: solução fisiológica, dose única; H2: 6 mg.kg-^{1} fracionado em duas doses(10% e 90% da dose total, com intervalo de 12 horas); C2: solução fisiológica fracionada em duas doses; CN: controle negativo.

Estruturas ovarianas, PG: oócito em crescimento primário; CA: oócito alvéolo-cortical; SG: oócito em crescimento secundário; FG: oócito *full-grown*; GVBD: oócito após a quebra da vesícula germinativa; POC: complexo pós-ovulatório; AT: oócito atrésico; TI: tecido intersticial. Letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos. Barras representam o erro padrão.

4.3.5. Correlações

Os valores de IGS se correlacionaram negativamente com as frequências de POC somente, sendo esta correlação moderada em todos os experimentos (Tabela 6). Entre os níveis plasmáticos de PGF2α e as frequências de POC, as correlações foram positivas, moderada nos experimentos 1 e 3, e fraca no experimento 2. Já entre os níveis plasmáticos de PGF2α e as frequências de GVBD, as correlações foram positivas fracas nos experimentos 1 e 3, e moderada no experimento 2. Entre os níveis plasmáticos de PGF2α e as frequências de FG as correlações foram positivas e moderadas nos experimentos 1 e 2, e fraca no experimento 3.

Tabela 6: Correlações de Spearman entre IGS, níveis plasmáticos de PGF2α e frequências de FG, GVBD e POC do experimento 1, 2 e 3.

Correlação ρ de Spearman	**Experimento 1**		**Experimento 2**		**Experimento 2**	
	grau	**ρ**	**grau**	**ρ**	**grau**	**ρ**
IGS x POC	moderada	-0,61	moderada	-0,41	moderada	-0,61
IGS x GVBD	ausente	0,15	ausente	0,03	ausente	-0,19
IGS x FG	ausente	0,03	ausente	0,04	ausente	0,29
PGF2α x POC	moderada	0,59	fraca	0,39	moderada	0,46
PGF2α x GVBD	fraca	0,31	moderada	0,42	fraca	0,34
PGF2α x FG	moderada	-0,44	moderada	-0,51	fraca	-0,31

O valor de ρ (rô) indica o grau da correlação entre as variáveis sendo considerada negligível de 0,0 a 0,10, fraca de 0,10 a 0,39, moderada de 0,40 a 0,69, forte de 0,70 a 0,89 e muito forte de 0,90 a 1,0Valores negativos indicam correlação negativa entre as variáveis. Valores positivos indicam correlação positiva entre as variáveis. IGS: Índice gonadossomático; POC: complexo pós-ovulatório; GVBD: oócito com quebra da vesícula germinativa; FG: oócito *full-grown*.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo observamos resultados similares relativos ao desempenho reprodutivo dos distintos grupos tratados e controles, corroborando com CHEHADE *et al.*, 2015, que mostram que o *A. altiparanae* pode desovar sem indução hormonal. No entanto, usando o desenho experimental aqui proposto, mostramos por meio de análises histológicas e níveis plasmáticos de PGF2α que o tratamento hormonal com EBHC potencializa a maturação final e desova nesta espécie. Além disso, apesar do aparente aumento na frequência de fêmeas desovadas e número absoluto de embriões viáveis em alguns experimentos nos grupos tratados, as vezes com tendência dose-dependente, pelo fato destas variáveis não poderem ser submetidas a testes estatísticos, não pudemos demonstrar um efeito da dose sobre o desempenho reprodutivo. Além disso, animais de lotes diferentes podem apresentar respostas diferentes quando submetidos aos mesmos tratamentos. Observamos também que o uso da dose fracionada de 6 $mg.kg^{-1}$ EBHC proporcionou um aumento do desempenho reprodutivo em relação a dose única, evidenciado pelos níveis significativamente maiores de PGF2α e maior frequência de POC em relação aos demais grupos na amostragem final (“24h”) do terceiro experimento. Finalmente mostramos que um aumento nos níveis plasmáticos de PGF2α associa-se com a desova nesta espécie por meio da observação de correlações positivas entre os níveis de PGF2α e POC (que é um indicativo de que ocorreu desova).

Nos experimentos 1 e 2, observamos que as frequências de FG nas fêmeas dos grupos tratados com EBHC diminuíram ao longo do tempo, indicando que a maturação final ocorreu (evolução de oócitos FG para GVBD). Porém, apenas os grupos tratados com $6mg.kg^{-1}$ ou $9mg.kg^{-1}$ de EBHC (T3 no experimento 1 e T2 no experimento 2) apresentaram um aumento significativo nos níveis de PGF2α na amostragem da desova (“6h”) em relação às amostragems anteriores. Da mesma forma que o grupo T1, os níveis de PGF2α do grupo C permaneceram similares ao nível basal ao longo dos experimentos. No experimento 3, o grupo H1 causou a maturação final em cerca de 75% dos animais, como podemos observar pela queda na frequência de FG e aumento na frequência de GVBD na amostragem “24h”. Já o

grupo C1, assim como nos experimentos com dose única, manteve altas frequências de FG até a amostragem ”24h”, mostrando novamente que a indução hormonal é necessária para ocorrer maturação final. Semelhante aos experimentos anteriores, os níveis de PGF2α destes grupos se mantiveram baixos ao longo do tempo. Com relação aos parâmetros reprodutivos no experimento 3, embora H2 tenha sido similar à C2 nas variáveis analisadas estatisticamente (volume médio de desova, taxas de fertilização, eclosão e número de embriões viáveis), o mesmo apresentou um desempenho satisfatório, evidenciado pela aparente maior frequência de fêmeas desovadas e aparente maior volume total de ovos (parâmetros não analisados estatisticamente), o que se traduz em um maior número de embriões viáveis e consequentemente, alevinos. O grupo que não recebeu nenhuma injeção (CN), apresentou uma única fêmea desovada. Este grupo também apresentou alta frequência de FG e uma mistura de baixas frequências de GVBD e POC na amostragem “24h”, indicando que esta fêmea desovou parcialmente, pois foram observados GVBD neste animal.

Com relação a possibilidade aqui aventada de padrões distintos de respostas usando diferentes lotes, neste estudo observamos um padrão de respostas similares, especialmente aos resultados obtidos entre tratados e controles e às doses aplicadas nos experimentos 1 e 2. O experimento 1 foi realizado com animais maiores e mais velhos (cerca de 2 anos de idade e massa média 42,40±7,10 g) que os animais do experimento 2 e 3 (cerca de 1 ano de idade, 14,98±3,56 e 16,45±6,41 g). Observamos, mesmo sem efeito estatístico, que o número de réplicas que desovam, fêmeas desovadas e volume de desova entre os lotes tende a variar. Diferenças entre lotes de origens diferentes são esperadas, SCHORER *et al.* (2016) reportaram que fêmeas velhas de *Piaractus mesopotamicus* apresentaram níveis plasmáticos de 17α-OHP inferiores em relação às fêmeas jovens no mesmo período. Apesar de não termos quantificado os níveis plasmáticos destas substâncias, sabemos que o 17α-OHP é precursor do 17α,20β-DHP (LUBZENS *et al.,* 2010; NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008; TOKARZ *et al.,* 2015) hormônio fundamental para a maturação final e ovulação dos oócitos (LUBZENS *et al*., 2010; KOHLI *et al.*, 2005; NAGAHAMA, 2007; TAKAHASHI *et al.,* 2016; TOKARZ *et al.*, 2015). Portanto, as diferenças encontradas podem ser explicadas tanto por características individuais

dentro do mesmo lote, ou às diferentes idades e massa dos animais empregados. Raras são as informações sobre o efeito das características genéticas dos lotes sobre seu desempenho reprodutivo (BOBE & LABBÉ, 2010) e estudos destes tipos são necessários para esta espécie onde já se sabe que as fêmeas apresentam melhores taxas de crescimento (GARUTTI, 2003), o que torna importante o desenvolvimento de linhagens monosexo (NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Neste estudo as grandes variações individuais apresentadas dentro de cada grupo tomadas conjuntamente com a presença de desova em grupos controle impediu a obtenção de respostas diretas que relacionassem o tratamento hormonal e o desempenho reprodutivo, como dito anteriormente. Analisando os resultados dos experimento 3, o fato de que nenhuma fêmea desovou com a dose única de 6 $mg.kg^{-1}$ ilustra ainda mais a dificuldade de se encontrar padrões reprodutivos no lambari. As doses únicas de 6 e 9 $mg.kg^{-1}$ foram as únicas que apresentaram elevações de PGF2α nos experimentos anteriores e sempre apresentavam réplicas (apesar de poucas) com desovas. Ainda com relação ao experimento 3, proposto para avaliar o efeito do fracionamento da dose, detectamos de forma inédita que a dose de $6mg.kg^{-1}$ de EBHC fracionada (H2) propiciou valores de PGF2α no momento da ovulação superiores à dose única de $6mg.kg^{-1}$ de EBHC (H1) como também superiores a todos os outros tratamentos. A dose fracionada de EBHC também propiciou uma maior frequência de POC (que é o principal indicativo de desova). Tomados conjuntamente estes fatores indicam que a maturação final e desova do lambari podem ser potencializadas por meio do fracionamento da dose de EBHC. Doses fracionadas de EBHC são utilizadas na maioria dos peixes nativos (CRISCUOLO-URBINATI *et al.*, 2012; FIGUEIREDO-ARIKI *et al.*, 2018; HAINFELLNER *et al.*, 2012; HONJI *et al.*, 2011; LIRA *et al.*, 2018; NAKAGHI *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018). Em carpas já foi demonstrado que o fracionamento da dose de gonadotropina potencializa a capacidade das fêmeas em produzir 17α,20β-DHP (LEVAVI-ZERMONSKY E YARON, 1986) e que só com este fracionamento um pico de 17α,20β-DHP, e consequentemente a ovulação, são obtidos. Recentemente foi demonstrado que o 17α,20β-DHP também é um potencial indutor de ovulação à desova em lambaris (BRAMBILA-SOUZA *et al.*, 2019) e futuros trabalhos poderiam associar o fracionamento da dose com picos de 17α,20β-DHP nesta espécie

também, uma vez que mostramos aqui tal associação com a PGF2α. Portanto, diferentemente da maioria dos trabalhos na literatura onde a dose única de EBHC é empregada (BEM *et al.* 2012; FELIZARDO *et al.,* 2012; LIRA *et al.,* 2018; NASCIMENTO *et al.,* 2017; SATO *et al.,* 2006; YASUI *et al.,* 2014), concluímos que a eficiência da dose fracionada de 6mg.kg^{-1} de EBHC é superior e deve ser utilizada para a reprodução em cativeiro de *A. altiparanae*.

No momento da desova, todas as fêmeas desovadas nos experimentos apresentaram níveis elevados de PGF2α (no mínimo 6 até 1433 vezes maior no experimento 1, 2 até 10 vezes maiores no experimento 2, e 2 até 7 vezes maiores no experimento 3) em relação aos níveis basais (0,33±0,06, 0,33±0,05 e 0,34±0,19 ng.ml^{-1}, respectivamente), o que corrobora com as concentrações (ovarianas) obtidas por LISTER e VAN DER KRAAK (2008; 2009). Além disso, as correlações positivas entre os níveis plasmáticos de PGF2α e as frequências de GVBD e POC (Tabela 6) sugerem que a PGF2α participa diretamente da maturação final e ovulação, o que corrobora com o observado na literatura (JOY & SINGH, 2013) ou indiretamente, através da sua relação com o 17α,20β-DHP (HENROTTE *et al*., 2011; KNIGHT & VAN DER KRAAK, 2015; LISTER & VAN DER KRAAK, 2008; LISTER & VAN DER KRAAK, 2009). Em *Danio rerio*, produção de prostaglandinas é estimulada pelo LH (LISTER & VAN DER KRAAK, 2008; 2009) da mesma forma que a síntese do 17α,20β-DHP (LUBZENS *et al.,* 2010; NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008). Isto pode explicar porque os níveis de PGF2α dos tratamentos de 6 mg.kg^{-1} e 9 mg.kg^{-1} foram maiores no momento da desova, e também porque a dose de 3 mg.kg^{-1} não foi eficiente para estimular a maturação final e ovulação nos experimentos 1 e 2. Pode também explicar a razão das fêmeas do grupo H1 do experimento 3 terem apresentado maturação final mas não terem ovulado, já que o caminho que leva à maturação final e à ovulação são claramente distintos, mesmo os dois processos sendo promovidos pelo 17α,20β-DHP (NAGAHAMA E YAMASHITA, 2008). Desta forma, as correlações positivas entre os níveis plasmáticos PGF2α e a frequência de POC nos indica que a PGF2α pode estar diretamente relacionada com a desova. PEREIRA *et al.* (2013) observaram uma correlação positiva moderada entre os níveis de 17α-OHP (precursor do 17α,20β-

DHP) e a frequência de POCs, o que aumenta a necessidade de se estudar os níveis de 17α,20β-DHP e correlacionar com os níveis de PGF2α dos mesmos.

Um outro aspecto que destacamos aqui são diferenças entre as fêmeas não desovadas de grupos controles e tratados. Nos grupos controle (sem indução hormonal) as fêmeas não desovadas não apresentavam migração e quebra da vesícula germinativa, permanecendo com oócitos vitelogênicos com núcleo central. Nos grupos tratados, principalmente no grupo de menor dose (3 $mg.kg^{-1}$), as fêmeas não desovadas tinham seus ovários predominantemente ocupados por oócitos com migração e quebra da vesícula germinativa. Estes fatos indicam que o tratamento hormonal provocou em todas as fêmeas tratadas pelo menos a maturação final, enquanto que nas fêmeas controles não desovadas a maturação final não foi obtida. Tomados conjuntamente estes aspectos indicam que possivelmente algum componente desconhecido esteja associado com a ovulação espontânea em fêmeas não induzidas. Por outro lado todas as fêmeas tratadas que não desovaram apresentaram oócitos GVBD retidos indicando também que componentes desconhecidos, possivelmente comportamentais ou fisiológicos (relacionados a presença de receptores de hormônios ou outros) estejam associados com a não evolução da maturação final para a ovulação nas fêmeas de *A. altiparanae.*

6. CONCLUSÃO

Concluímos que a indução com EBHC apresenta desempenho reprodutivo similar a grupos controle sem desova espontânea, quando consideramos a frequência de fêmeas desovadas por réplica.

Doses de 3, 6 ou 9 $mg.kg^{-1}$ de EBHC propiciam desempenho reprodutivo similar, porém a análise histológica os ovários e os níveis séricos de PGF2α no momento da desova indicaram que as doses de 6 ou $9mg.kg^{-1}$ potencializam o desempenho reprodutivo em relação 3 $mg.kg^{-1}$ e o controle.

As variações individuais e a presença de ovulação espontânea (que pode ser considerada não frequente) em *A. altiparanae* impedem conclusões com suporte

matemático sobre um eventual ganho no desempenho reprodutivo elevando-se as doses hormonais .

Concluímos também que a dose fracionada de 6mg.kg^{-1} de EBHC causou um aumento nos níveis de PGF2α no momento da desova, além de um ganho aparente no número total de embriões viáveis, devido a uma aparente maior frequência de fêmeas desovadas e a um aparente maior volume total de desova. Portanto, indicamos esta dose para a indução hormonal de *A. altiparanae*.

7. REFERÊNCIAS

ANKLEY, G.T.; GRAY, L.E. 2013. Cross-species conservation of endocrine pathways: a critical analysis of tier 1 fish and rat screening assays with 12 model chemicals, Environmental Toxicology and Chemistry, 32: 1084-1087.

BEM, J.C.; FONTANETTI, C.S.; SENHORINI, J.A.; PARISE-MALTEMPI, P.P. 2012. Effectiveness of estradiol valerate on sex reversion in *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). Brazilian Archives of Biology and Technology, 55: 283-290.

BOBE, J., LABBÉ, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology, 165: 535–548.

BRAMBILA-SOUZA, G.; MYLONAS, C.C.; MELLO, P.H.; KURADOMI, R.Y.; BATLOUNI, S.R.; TOLUSSI, C.E.; MOREIRA, R.G. 2019. Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season, General and Comparative Endocrinology. In press. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.02.016

BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. 2011. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. Marine and Coast Fisheries, 3 :52-70.

CASSEL, M.; CHEHADE, C.; BRANCO, G.S.; CAPENELLE, D.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M.I. 2017. Ovarian development and the reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over one year: Applications in fish farming. Theriogenology, 98: 1-15.

CASSEL, M.; CAMARGO, M,P.; JESUS, L.W.O.; BORELLA, M.I. 2017b. Involution processes of follicular atresia and post-ovulatory complex in a characid fish ovary: a study of apoptosis and autophagy pathways. Journal of Molecular Histology, 48: 243-257.

COSTA, F.G.; ADOLFI, M.C.; GOMES, C.C.; JESUS, L.W.O.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I. 2014. Tests of *Astyanax altiparanae*: the Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis. Micron, 61: 20-27.

CHEHADE, C.; CASSEL, M.; BORELLA, M.I. 2015. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. Neotropical Ichthyology, 13: 205-212.

CLELLAND, E.; PENG, C. 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development, Molecular and Cell Endocrinology, 312: 42–52.

CRESPO, D., PRAMANICK, K., GOETZ, F.W., PLANAS, J.V. 2013. Luteinizing hormone stimulation of in vitro ovulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) involves follicle contraction and activation of proteolytic genes. General and Comparative Endocrinology, 188: 175-182.

FELIZARDO, V.O.; MURGAS, L.D.S.; ANDRADE, E.S.; LÓPEZ, P.A.; FREITAS, R.T.F.; FERREIRA, M.R. 2012. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). Theriogenology, 77: 1570-1574.

FIGUEIREDO-ARIKI, D.G.; KURADOMI, R.Y.; DE SOUZA, T.G.; HAINFELLNER, P.; PORTO-FORESTI, F.; BATLOUNI, S.R. 2018. adhesiveness neutralization in eggs of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei: Siluriformes: Pimelodidae). Boletim do Instituto de Pesca, 44: 11-23.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia, 13: 65-88.

GARUTTI, V. 2003. Piscicultura ecológica. UNESP, 332p.

GODINHO, H.P. 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 31: 351-360.

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.

HENROTTE, E., MILLA, S., MANDIKI, S.N., KESTEMONT, P. 2011. Arachidonic acid induces production of 17,20b-dihydoxy-4-pregnen-3-one (DHP) via a putative PGE2 receptor in fish follicles from the Eurasian perch. Lipids, 46: 179-187.

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: 363-370.

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

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, 246: 150-163.

JOY, K.P.; SINGH, V. 2013. Functional interactions between vasotocin and prostaglandins during final oocyte maturation and ovulation in the catfish *Heteropneustes fossilis*. General and Comparative Endocrinology, 186: 126-135.

KAGAWA, H.; TANAKA, H.; UNUMA, T.; OHTA. H.; GEEN, K.; OZUKAWA, K. 2003. Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Fisheries Science, 69: 234-241.

KNIGHT, O.M.; VAN DER KRAAK, G. 2015. The role of eicosanoids in 17α, 20β-dihydroxy-4 pregnen-3-one-induced ovulation and spawning in *Danio rerio*. General and Comparative Endocrinology 213: 50-58.

KOHLI, G.; CLELLAND, E.; PENG, C. 2005. Potential targets of transforming growth factor-beta1 during inhibition of oocyte maturation in zebrafish, Reproductive biology and endocrinology, 3: 53.

KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S.R. 2018. PGF2α and gonadal steroid plasma levels of successful and unsuccessful spawning *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Characiformes) females. Aquaculture International, 26: 1083-1094.

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, 65: 34–89.

LIRA, L.V.G.; KURADOMI, R.Y.; DE SOUZA, T.G.; HAINFELLNER, P.; BATLOUNI, S.R. 2018. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. Boletim do Instituto de Pesca, *In press.*

LISTER, A.L., VAN DER KRAAK, G., 2008. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. General and Comparative Endocrinology, 159: 46-57.

LISTER, A.L., VAN DER KRAAK, G.L., 2009. Regulation of prostaglandin synthesis in ovaries of sexually-mature zebrafish (*Danio rerio*). Molecular Reproduction and Development, 76: 1064-1075.

LUBZENS, E.; G. YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÀ, J. 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed, General and Comparative Endocrinology, 165: 367-389.

MYLONAS, C.C.; ZOHAR, Y. 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. Pp. 437-474. In: Babin, P. J., J. Cerdà & E. Lubzens (Eds.). The Fish Oocyte: from basic studies to biotechnological applications. Dordrecht, Netherlands, Springer.

MYLONAS, C. C., FOSTIER, A., ZANUY, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165: 516-534.

NAGAHAMA, Y. 1997. 17alpha,20beta-Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action, Steroids, 62: 190-196.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. Development, Growth & Differentiation, 50: 195-219.

NAKAGHI, L.S.O.; NEUMANN, E.; FAUSTINO, F.; MENDES, J.M.R.; DE BRAGA, M.R. 2014. Moments of induced spawning and embryonic development of *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). Zygote, 22: 549-57.

NASCIMENTO, N.F.; PEREIRA-SANTOS, M.; PIVA, L.H.; MANZINI, B.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J.A.; YASUI, G.S.; NAKAGHI, L.S.O. 2017. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae.* Aquaculture, 471: 163–171.

ORBOLATO, T.S.; GIRARDI, L.; AQUINO-SILVA, M.R.; FIORINI, M.P. 2006. Reprodução induzida do lambari, *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus,1758). Anais do X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, p. 212-215.

PEREIRA, T.S.B.; BOSCOLO, C.N.P.; MOREIRA, R.G.; BATLOUNI, S.R. 2018. *Leporinus elongatus* induced spawning using carp pituitary extract or mammalian GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists Animal Reproduction, v.15, n.1, p.64-70

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B. 2001. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. Panorama da Aquicultura, 11: 15-19.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GRIER, H.; MAZZONI, T.S.; NOBREGA, R.H.; AMORIM, J.P.A. 2011. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): germline cysts, follicle formation and oocyte development. Journal of Morphology, 272: 1290-1306.

READING, B.J.; SULLIVAN, C.V.; SCHILLING, J. 2017. Vitellogenesis in Fishes. Elsevier Inc.

SATO, Y; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R. 2006. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 23(1): 267-273.

SCHOBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L.A. 2018. Correlation Coefficients. Anesthesia & Analgesia, 126: 1763-1768.

SCHORER, M.; MOREIRA, R.G.; BATLOUNI, S.R. 2016. Selection of pacu females to hormonal induction: effect of age and of evaluation methods. Boletim do Instituto de Pesca, 42: 901-923.

SCHULZ, R.W.; FRANÇA L.R.; LAREYRE, J.J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R.H.; MIURA, T. 2010. Spermatogenesis in fish, General and Comparative Endocrinology., 165: 390-411.

SIQUEIRA-SILVA, D.H.; SILVA, A.P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. 2015. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. Theriogenology, 84: 1033-1042.

SORBERA, L., ASTURIANO, J., CARRILLO, M., ZANUY, S., 2001. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Biology of Reproduction, 64: 382-389

SUZUKI, H.I.; BULLA, C.K.; AGOSTINHO A.A.; GOMES, L.C. 2005. Estratégias reprodutivas de assembleias de peixes em reservatórios. Pp. 223-236. In: Rodrigues, L., S. M. Thomaz, A. A. Agostinho & L. C. Gomes (Orgs.). Biocenoses em Reservatórios: padrões espaciais e temporais. São Carlos, RiMa Editora.

TAKAHASHI, A., KANDA, S., ABE, T., OKA, Y., 2016. Evolution of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation in vertebrates revealed by knockout medaka. Endocrinology, 157: 3994-4002.

TAKAHASHI, T.; HAGIWARA, A.; OGIWARA, K. 2012. Prostaglandins in teleost ovulation: A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation, Molecular and Cellular Endocrinology, 461: 236-247.

THOMAS, P. 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models, General and Comparative Endocrinology, 175: 367-383.

TOKARZ, J.; MÖLLER, G.; HRABĚ de ANGELIS, M.; ADAMSKI, J. 2015. Steroids in teleost fishes: a functional point of view. Steroids, 103: 123-144.

VON IHERING. R.; AZEVEDO, P. 1936. A desova e a hipofisação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. Arquivos do Instituto de Biologia, 7: 107-118.

YABUKI, Y., KOIDE, T., MIYASAKA, N., WAKISAKA, N., MASUDA, M., OHKURA, M., NAKAI, J., TSUGE, K., TSUCHIYA, S., SUGIMOTO, Y., YOSHIHARA, Y. 2016. Olfactory receptor for prostaglandin F2a mediates male fish courtship behavior. Nature Neuroscience, 19: 897-904.

YASUI, G.S.; SENHORINI, J.A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L.S.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L.A. 2014. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. Animal, 9: 464-470.

ZANIBONI-FILHO, E., WEINGART, M. 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 31: 367-373.

ZOHAR, Y., MUÑOZ-CUETO, J.A., ELIZUR, A., KAH, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. General and Comparative Endocrinology, 165: 438-455.