UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Desempenho reprodutivo e diferenciação gonadal em piau-três-pintas, *Leporinus friderici*, Bloch 1794.

Thiago Gonçalves de Souza
Zootecnista

Jaboticabal, São Paulo
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Desempenho reprodutivo e diferenciação gonadal em piau-três-pintas, *Leporinus friderici*, Bloch 1794.

Thiago Gonçalves de Souza

Orientador: Dr. Sergio Ricardo Batlouni

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

Jaboticabal, São Paulo
2015

Souza, Thiago Gonçalves de
S729d Desempenho reprodutivo e diferenciação gonadal em piau-três-pintas, *Leporinus friderici*, Bloch 1794 / Thiago Gonçalves de Souza. – – Jaboticabal, 2015
v, 80 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, 2015
Orientador: Sergio Ricardo Batlouni
Banca examinadora: Maria Inês Borella, Rafael Henrique Nóbrega, Diogo Teruo Hashimoto, George Shigueki Yasui
Bibliografia

1. Reprodução. 2. Dose eficaz. 3. Temperatura. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura da UNESP.

CDU 639.3.03

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

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Desempenho reprodutivo e diferenciação gonadal em piau-três-pintas, Leporinus friderici, Bloch 1794

AUTOR: THIAGO GONÇALVES DE SOUZA

ORIENTADOR: Prof. Dr. 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 / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NOBREGA
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu

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

Profa. Dra. MARIA INÊS BORELLA
Departamento de Histologia e Embriologia / Universidade de São Paulo

Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO
Laboratório de Genética de Peixes, CAUNESP, Jaboticabal-SP

Data da realização: 30 de julho de 2015.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO ESPECIAL 1

AGRADECIMENTOS 2

APOIO FINANCEIRO 3

RESUMO 4

ABSTRACT 5

1. **INTRODUÇÃO GERAL** 6
   1.1 Fisiologia da reprodução 9
   1.2 Técnicas de indução hormonal 11
   1.3 Doses e protocolos de indução hormonal 12
   1.4 Diferenciação sexual em peixes de interesse para a piscicultura 13
2. **OBJETIVOS** 15
   2.1 Objetivos gerais 15
   2.1.1 Objetivos específicos 16
3. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 16

MANUSCRITO I 21

Obtenção de embriões viáveis de *Leporinus friderici* com doses convencionais e reduzidas de extrato bruto de hipófise de carpa e mGnRHa. 21

RESUMO 22

ABSTRACT 23

1. INTRODUÇÃO 24
2. MATERIAL E MÉTODOS 28
   2.1 Captura de reprodutores e matrizes 28
   2.2 Peixes e manejo 28
   2.3 Parâmetros de qualidade da água. 29
   2.4 Administração de hormônios 29
   2.5 Reprodução induzida 29
   2.6 Avaliação do desempenho reprodutivo 30
   2.7 Avaliação dos ovários pós-desova 31
   2.8 Análise descritiva e estereológica dos ovários 32
   2.9 Determinação do diâmetro das células ovocitárias 32
   2.10 Certificação do trabalho 32
   2.11 Análise dos resultados 33
3. RESULTADOS 34
   3.1 Peixes, manejo e qualidade da água 34
   3.2 Características das matrizes e reprodutores 34
   3.3 Reprodução induzida e desempenho reprodutivo 36
   3.4 Análise descritiva e morfometria dos ovários 38
4. DISCUSSÃO 42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48

MANUSCRITO II 54

Efeito de duas temperaturas (25 e 29ºC) na diferenciação gonadal de piau-três-pintas, *Leporinus friderici*. 54

RESUMO 55

ABSTRACT 56

1. INTRODUÇÃO 57

2. MATERIAL E MÉTODOS 61

2.1 Origem dos animais 61

2.2 Larvicultura 61

2.3 Delineamento experimental 62

2.4 Parâmetros de qualidade da água 63

2.5 Biometrias e preparos histológicos 63

2.6 Diferenciação sexual 64

2.7 Certificação do trabalho 64

2.8 Análise dos resultados 65

3. RESULTADOS 66

3.1 Parâmetros de qualidade da água. 66

3.2 Dados biométricos 66

3.3 Análise macro e microscópica das gônadas 69

3.3.1 Diferenciação gonadal 69

3.3.2 Diferenciação ovariana 69

3.3.3 Diferenciação testicular 69

3.4 Evolução da diferenciação sexual 70

4. DISCUSSÃO 74

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77

4. **COMENTÁRIOS FINAIS** 80

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Deus

Agradeço a Deus por abençoar, proteger e conceder saúde a minha família.

À minha família

Agradeço aos meus pais Norlei G. de Souza e Inês Ap. G. de Souza, aos meus irmãos Artur G. de Souza e Mateus G. de Souza e minha namorada Juliana G. Thomaz.
Essas pessoas são fundamentais em minha vida, sempre me ajudaram e incentivaram em tudo que me propus a fazer.
Amo muito vocês!!

Ao Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni

Agradeço imensamente ao Prof. Sergio por ser uma pessoa presente, disposta e ativa nos momentos certos. Agradeço por nunca medir esforços para ajudar as pessoas ao seu redor, por compartilhar sua sabedoria e principalmente pela sua amizade.

Aos amigos do Laboratório

Agradeço a todos do Laboratório de Reprodução de Peixes Nativos em especial a Patrick Hainfellner, Rafael Y. Kuradomi, Daniel G. A. Figueiredo, Valeria L. Guerra, Guilherme A. de Freitas e Roosevelt Passos, pela grande ajuda, amizade, companheirismo e dedicação nos momentos mais difíceis. Essas pessoas, sem dúvida alguma, influenciaram de maneira direta minha trajetória nesse período.

Muito Obrigado!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço as inúmeras pessoas que me ajudaram no decorrer do doutorado, especialmente:

- À todos os funcionários do Caunesp, em especial ao Valdecir e Marcio, por sempre estarem dispostos a ajudar, tanto nos dias bons quanto nos ruins.

- À Suely, proprietária da Piscicultura Projeto Peixes, pela imensa ajuda em várias etapas desse trabalho. Essa profissional de excelência nos auxiliou em diversas oportunidades com seu grande conhecimento e imensa dedicação. Agradeço também todos os seus familiares e funcionários por sempre estarem presentes ao lado dela.

- À todos do laboratório de genética, Vito, Lucas, Paulo e Milene, pelo companheirismo e ajuda de todos.

- A Duke Energy Brasil e Celan por todo o suporte e apoio na captura das matrizes e reprodutores em ambiente natural.

- Aos professores, Dra. Laura S. O. Nakaghi e Dr. Diogo T. Hashimoto por me ajudarem com sugestões e correções em minha qualificação.

- Aos professores, Dra. Maria Inês Borella Dr. Rafael H. Nóbrega, Dr. Diogo T. Hashimoto e Dr. George Shigueki Yasui, por participarem e auxiliarem com sugestões e críticas em minha defesa.

- Aos Professores e Colegas do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos em especial à Profa. Fabiana Pilarski pela ajuda, convívio, companheirismo e empréstimo de material.

- Aos Professores e Colegas do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal em especial à Profa. Laura S. O. Nagashi, Fernanda N. Valentin e Nivaldo F. do Nascimento pela ajuda, companheirismo e empréstimo de material.

- Aos Professores e Colegas do Setor de Peixes Ornamentais em especial ao Julian, pela ajuda e amizade.

- Aos amigos e colegas de outros laboratórios, Melanie Digmayer, Marianne Schorer, Thiago Scremin, Camila Nomura, pelo grande apoio.

Enfim... A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram na concretização deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Bolsa de Doutorado, Processo nº **2012/14901-7**.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ, Bolsa de Doutorado, Processo nº **141936/2012-6.**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Bolsa de Doutorado.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o desempenho reprodutivo e o processo de diferenciação gonadal do *Leporinus friderici.* Primeiramente avaliamos a evolução do processo meiótico e o desempenho reprodutivo de matrizes de *L. friderici* induzidas com doses convencionais e reduzidas de extrato bruto de hipófise de carpa (EC) e de hormônio liberador de gonadotropinas análogo ao de mamífero associado à metoclopramida (mGnRHa + MET). Posteriormente, investigamos o início e as características do processo de diferenciação gonadal desta espécie expostos a 25 e 29ºC. Para a avaliação do desempenho reprodutivo, utilizamos o EC em doses de 0,5 e 5,5mg/Kg (doses convencionais) e em doses de 0,5 e 1,0mg/Kg (doses reduzidas). Paralelamente utilizamos dose única de 40µg de mGnRHa + 20mg de MET/Kg (dose convencional) e duas doses de 4µg + 2mg; e 8µg + 4mg, de mGnRHa + MET/Kg (doses reduzidas). Para avaliação do processo de diferenciação gonadal foram amostrados aleatoriamente cinco peixes com 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210 e 240 dias após eclosão (DAE), expostos a 25 e 29ºC, em sistema de recirculação de água. Concluimos que embriões viáveis de *L. friderici* podem ser obtidos com doses reduzidas de EC, mas não com doses convencionais. Não foi possível obter embriões viáveis de *L. friderici* com uso de mGnRHa + MET, pelo menos com as doses e procedimentos aqui empregados, pois estes causaram baixa fertilidade, baixa eclosão e redução da qualidade dos ovos. Com relação ao processo de diferenciação gonadal, demonstramos que a temperatura mais elevada (29ºC) provocou aumento no comprimento padrão (CP) e peso médio (P), intensificou a diferenciação gonadal e propiciou um maior número de fêmeas de *L. friderici*. Concluindo, é possível que a espécie apresente alguma toxicidade provocada pelo excesso de GnRH, hormônio luteinizante ou aos esteroides gonadais, os quais seriam transmitidos da fêmea para os embriões antes do processo de ovulação, provocando a morte dos mesmos. Com relação à produção de fêmeas, que é o gênero de maior interesse econômico, possivelmente pode ser obtida em maior proporção com a incubação à temperatura de 29ºC, próximo aos 190 DAE, uma vez que a espécie apresentou 100% de sobrevivência e melhores médias de CP e P, nessas condições.

Palavras-chave: piau-três-pintas; reprodução; dose eficaz; determinação sexual, intensificação, fêmeas, temperatura.

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the reproductive performance and gonadal differentiation process *Leporinus friderici*. First we assess the evolution of the meiotic process and the reproductive performance of *L. friderici* broodstock induced with conventional and lower dose of crude carp pituitary extract (EC) and mammalian gonadotropin releasing hormone analogue associated with metoclopramide (mGnRHa + MET). Subsequently, we investigated the beginning and the characteristics of gonadal differentiation process of this species exposed at 25 and 29ºC. For the evaluation of reproductive performance, we used the EC at doses of 0.5 and 5.5 mg / kg (conventional dose) and at doses of 0.5 and 1.0mg / kg (lower doses). Parallel use of a single dose of 40µg + 20mg mGnRHa MET / kg (conventional dose) and two doses of 4µg + 2mg; and 4µg + 8mg of mGnRHa + MET / kg (lower doses). For evaluation of gonadal differentiation process were randomly sampled five fish 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210 and 240 days after hatching (DAE), exposed to 25 and 29°C in recirculation system water. We conclude that viable *L. friderici* embryos can be obtained with low doses of EC, but not with standard doses. Could not get viable embryos *L. friderici* with use of mGnRHa + MET, at least with the doses and procedures used here, as these caused low fertility, low hatching and reduced egg quality. With respect to gonadal differentiation process, we have demonstrated that the higher temperature (29°C) caused an increase in average weight (P) and standard length (CP), intensified gonadal differentiation and provided a greater number of females *L. friderici*. In conclusion, it is possible that the species has any toxicity caused by excess GnRH, luteinizing hormone or the gonadal steroids, which would be transmitted to the female embryos before the ovulation process, killing them. With the production of females, which is the genre of greater economic interest, it can possibly be obtained in greater proportion to the incubation at 29°C, close to 190 DAE, since the species showed 100% survival and better averages CP and P, in these conditions.

Key-words: piau-três-pintas; reproduction; effective dose; sex determination, intensification, females, temperature.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O piau-três-pintas, *Leporinus friderici*, (Bloch, 1794) (=*Leporinus copelandii*) é uma espécie reofílica da família Anostomidae que ocorre em diversas bacias Sul-americanas (Nomura, 1970; Garavello, 1979; Andrade *et al*., 2005). O *L. friderici* necessita da corrente fluvial para ter acesso a um local de reprodução e de outro local para alimentação, crescimento e engorda (Nomura, 1970). Essa espécie apresenta fecundação externa, com período reprodutivo de novembro a fevereiro (Garavello, 1979). Estudos em ambiente natural mostram, nessa espécie, uma frequência maior de fêmeas em classes de comprimentos mais elevados, enquanto os machos são mais frequentes em classes inferiores (Rêgo, 2008; Lopes *et al*., 2000). Essa espécie apresenta qualidade de carne elevada, aceitação para pesca esportiva (Andrade e Vidal, 1991), importância para a pesca comercial e de subsistência (Vaz *et al*., 2000).

O *L. friderici* está presente em rios que sofrem represamento (Agostinho *et al*., 1997; Durães *et al*., 2001; Albrecht *et al*., 2003; Bizzotto, 2006), e por isso muitas vezes tem seus processos migratórios e reprodução natural prejudicados. Além dessas razões, relatos indicam que os estoques naturais dessa espécie estão sendo reduzidos devido à degradação ambiental e a pesca predatória (Andrade *et al*., 2005). Existe a procura de alevinos de *L. friderici* para aquicultura e programas de repovoamento em rios e reservatórios, em grande parte do território nacional (Suplicy, 2007). Os últimos registros, demonstram que o Brasil produziu no ano de 2005 pouco mais de 5 milhões de alevinos de *L. friderici* tentando suprir todos esses nichos de mercado (Suplicy, 2007).

Alguns dados, obtidos com indivíduos coletados em ambiente natural,

são inconsistentes a respeito da idade e comprimento de primeira maturação. Nomura (1970) relata que a idade de primeira maturação ocorre com 5 anos nos machos e com 6 anos nas fêmeas. Em contrapartida, Godoy (1975) relata maturidade com 2 e 3 anos para machos e fêmeas respectivamente. O comprimento médio de primeira maturação varia entre 11,5 a 32,0cm em fêmeas e 11,5 a 22,5cm em machos (Nomura, 1970; Lopes *et al*., 2000; Rêgo, 2008). Também são incongruentes as informações sobre o tipo de desova da espécie. Nomura (1970) descreve a espécie como de desova parcelada, enquanto que Suzuki (1992) e Costa *et al*. (2005) como de desova total.

Diante dessas informações, fica evidente a falta de um pacote tecnológico definido para a produção da espécie, bem como informações sólidas sobre o desempenho reprodutivo, as fases de criação e o tempo de abate do *L. friderici*. Apesar disso, a demanda de informações consistentes sobre a criação desta espécie é crescente, principalmente por figurar entre as espécies mais abundantes e recorrentes em rios que sofrem represamento, para instalação de hidrelétricas e pequenas centrais hidrelétricas (PCHs) na região sudeste (Albrecht *et al*., 2003).

Desta maneira, esse estudo está inserido na proposta das empresas: Central Elétrica Anhanguera Ltda. (CELAN), responsável pela construção da Pequena Central Hidrelétrica Anhanguera (PCH Anhanguera), e Duke Energy Brasil – Pequenas Centrais Elétricas Ltda. (DEB), responsável pelas Pequenas Centrais Hidrelétricas Palmeiras e Retiro, como intuito de auxiliar no programa de reposição de estoques de peixes nativos, para o cumprimento das medidas previstas nos licenciamentos ambientais. Assim sendo, para a produção e soltura de alevinos é necessário o aprimoramento do processo reprodutivo. No

entanto, as informações da literatura com essa abordagem são muito escassas.

De acordo com as informações da literatura foi observado que a aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (EC), na concentração de 0,4 e 4mg.kg^{-1} (com intervalo entre doses de 12h) e aplicação prévia de 0,25 mg.kg^{-1} (~8h antes da primeira dose), foram eficazes para a ovulação de *L friderici* em sistema de fertilização a seco, porém sem sucesso na obtenção de embriões viáveis (Rezende *et al*., 1996). Outros estudos com doses de EC, na concentração de 0,5 e 5,0mg.kg^{-1} (com intervalo entre doses de 12 horas) e aplicação prévia de 0,25 mg.kg^{-1} (de um a três dias antes da primeira dose), demonstraram que ~55% das fêmeas desovaram e ~48% dos ovócitos foram fertilizados, no entanto, não demonstraram dados de eclosão (Zaniboni-Filho e Barbosa, 1996).

Estudos com embriões dessa espécie foram realizados por outros pesquisadores, no entanto, sem informações de desempenho reprodutivo das matrizes que viabilizaram as desovas (Sanches *et al*., 2001). Desta forma, os dados de desempenho reprodutivo, como a taxa de eclosão, muitas vezes são omissos, dificultando o aprimoramento das doses para a obtenção de embriões viáveis. Quando presentes ficam evidentes a ineficácia dessas doses em originar a progênie.

Em nossos estudos preliminares (dados não divulgados) e de acordo com informações empíricas de produtores, as doses convencionais de EC (0,5 e 5,0mg.kg^{-1}, com intervalo entre doses de 12h) não propiciaram a obtenção de embriões viáveis em *L. friderici*. Todavia, doses não usuais relativamente baixas de EC (0,5 e 1,0mg/Kg, com intervalo de 6 horas) em sistema de semi-

natural, se mostraram eficazes na obtenção de embriões, assim como encontrado por Lopes e Leal (2010) em *Schizodon fasciatus.* Desta forma, existe a necessidade de estudos científicos visando à otimização da reprodução induzida do *L. friderici*, assim como estudos para elucidar os mecanismos fisiológicos responsáveis pelas falhas e sucessos reprodutivos.

1.1 Fisiologia da reprodução

Em peixes reofílicos, a reprodução é modulada por fatores ambientais, como temperatura, fotoperíodo, chuvas, entre outros (Brooks *et al*., 1997; Peter e Yu, 1997; Bobe e Labbé, 2009), e controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que por sua vez é responsavel pela síntese e liberação de gonadotropinas e esteroides gonadais (Lubzens *et al*., 2010; Mylonas *et al*., 2010). Dessa maneira, os fatores ambientais supracitados são captados pelos peixes por meio dos seus orgãos sensoriais, como os olhos, glândula pineal, receptores cutâneos e epitélio olfatório (Prötner, 2002; Korf, 2006), e são trasmitidos pelos neurônios sensoriais ao hipotálamo (região específica do cérebro). Desta forma, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e a dopamina (DA). O GnRH exerce influência na liberação de gonadotropinas (GtHs) pela hipófise e a DA atua na hipófise inibindo a liberação de GtHs, atenuando a ação do GnRH (Cnaani e Levavi-Sivan, 2009). As células GtHs sintetizam os hormônios folículos estimulantes (Fsh) e o hormonio luteinizante (Lh).

Nas fêmeas, resumidamente, o Fsh atua na conversão do colesterol em testosterona (T) nas camadas foliculares e teca dos ovócitos (Nagahama e Yamashita, 2008; Lubzens *et al*., 2010). A T é convertida em 17β-estradiol (E2) pela aromatase (*cyp19a1a*), enzima chave na conversão de andrógenos em

estrógenos (Simpson *et al*., 1994). O E2 atua no fígado estimulando a síntese de vitelogenina, proteína precursora do vitelo (acúmulo de nutrientes), promovendo o crescimento do ovócito (Patiño e Sullivan, 2002). Dessa forma, na fase de vitelogênese, o ovócito acumula substâncias de reservas, necessários para o desenvolvimento adequado do embrião (Lubzens *et al*., 2010). Nas fases finais da vitelogênese, maturação final e ovulação, o Lh estimula a camada teca do folículo a sintetizar o 17α-hidroxiprogesterona (17α-OHP), que é convertida a 17α,20β-dihidroxy-4-pregnen-3-one (ou 17α,20β-21-trihidroxy-4-pregnen-3-one em algumas espécies) (MIS) na camada granulosa, pela enzima 20α-hidroxiesteróide-desidrogenase (Nagahama e Yamashita, 2008). O MIS é conhecido como o hormônio indutor da maturação final e da ovulação, em muitas espécies de teleósteos induzindo a retomada da meiose dos ovócitos (Zohar e Mylonas, 2001; Nagahama e Yamashita, 2008). Nos machos, o Fsh está envolvido nas fases iniciais da espermatogênese e o Lh na espermiogênese e espermiação (Mylonas et al., 1996). Os esteroides sexuais são sintetizados, principalmente, pelas células de Leydig (Fostier et al., 1983; Guraya, 2001). Nos peixes, em geral, a testosterona participa como precursor de 17β-estradiol (Nakamura et al, 1998; Baroiller et al., 1999). Os andrógenos, T e 11-KT, são os principais hormônios ligados ao desenvolvimento testicular e as características sexuais secundárias (Schulz et al., 2010).

Em condições de cultivo, normalmente a espermatogênese e vitelogênese ocorrem naturalmente na maioria das espécies reofilicas, mantidas a condições ideais (Buchet et al., 2008; Okumura et al, 2003). No entanto, para que sucedam as etapas finais do processo de reprodução, principalmente o processo de maturação final e ovulação das fêmeas, são

necessárias interferências humanas. Desta maneira, existe a possibilidade de estimular a reprodução dos peixes migradores através da indução ambiental [(como diminuição da condutividade, aumento do nível de água, simulação de chuvas (Kirschbaum 1984), manipulação do fotoperíodo (Harvey e Carolsfeld, 1993), entre outros)] ou pela aplicação de técnicas de indução hormonal (Von Ihering e Azevedo, 1936). Contudo, as técnicas de indução hormonal são aplicadas com mais frequência devido à complexidade de simulação dos fatores ambientais, em condições de cultivo (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

1.2 Técnicas de indução hormonal

Os peixes reofílicos quando mantidos em cativeiro precisam invariavelmente ser induzidos hormonalmente à desova (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007; Mylonas *et al.*, 2010). Neste contexto, no Brasil seguramente a metodologia para a indução hormonal mais aplicada é a hipofisação (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). Este método foi desenvolvido na década de 1930 (Von Ihering e Azevedo, 1936 e Menezes, 1954), a partir da aplicação de extrato bruto de hipófise (EC), que promove a maturação final e ovulação do ovócito (Nagahama e Yamashita, 2008, Mylonas *et al.*, 2010). No entanto, esta técnica, apesar de muito eficaz, continua trazendo resultados inesperados e desfavoráveis. Muitas vezes, fêmeas consideradas “aptas” (maduras) à indução hormonal não respondem satisfatoriamente e não ovulam (Criscuolo-Urbinati *et al.,* 2012; Hainfellner *et al.,* 2012).

Não obstante, a hipofisação ainda apresenta algumas limitações. Primeiramente, o EC possuem além do hormônio luteinizante (Lh), hormônios de crescimento, osmorreguladores e outros (Harvey e Hoar, 1979; Mylonas *et*

al., 2010), os quais podem prejudicar a reprodução. Além disso, os extratos brutos podem agir como transmissores de doenças (Donaldson e Hunter, 1983) e seus efeitos nem sempre são previsíveis, podendo estimular a desova em 100% das fêmeas injetadas, como também em nenhuma, com uma grande amplitude de resultados (Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012). Em contrapartida, o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) atua em níveis superiores do eixo hipotálamo-pituitária-gônadas e por isso proporciona uma estimulação mais balanceada dos eventos reprodutivos. Além disso, pode ser usado em concentração exata e predefinida, e evita o risco de transmissão de doenças aos reprodutores (Zohar e Mylonas, 2001; Mylonas *et al.*, 2010).

Assim, a fim de obter desovas bem sucedidas e uma maior previsibilidade nos resultados, pesquisadores têm buscado o uso de produtos sintéticos, como o GnRH análogos ao de mamíferos (mGnRHa) associado ao antagonista de dopamina, metoclopramida (MET), (mGnRHa + MET). Existem alguns registros de sucesso na indução à desova de espécies reofílicas sul-americanas com a utilização do GnRH (Carolsfeld *et al.*, 1988; Zaniboni-Filho e Barbosa, 1996), mas os dados são escassos e incipientes.

1.3 Doses e protocolos de indução hormonal

Até os dias atuais, geralmente, preconiza-se a administração de EC em duas doses nas fêmeas (doses convencionais). A primeira (dose preparatória) é administrada em concentração baixa de EC (geralmente de 0,3 a 0,5mg de EC /kg^{-1} de peso corporal), e após 12 a 24 horas (Woynarovich e Horváth, 1983) a segunda dose (dose decisiva) é administrada em concentrações geralmente dez vezes maiores (3 a 5mg de EC /kg^{-1} de peso corporal), correspondendo a uma concentração total de 3,3 a 5,5mg de EC /kg^{-1} de peso

corporal (Woynarovich e Horváth, 1983; Harvey e Carolsfeld, 1993; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). A primeira dose acelera o desenvolvimento das gônadas e estimula a migração da vesícula germinal. A segunda dose induz a quebra da vesícula germinal, ovulação e desova (Woynarovich e Horváth, 1983; Harvey e Carolsfeld, 1993; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

Levavi-Zermonsky e Yaron (1986) demonstraram, na década de 1980, em carpa comum que mudanças na esteroidogênese precedem uma desova bem sucedida. Por falta de padronização na maioria dos métodos convencionais, Levavi-Zermonsky e Yaron (1986) utilizaram duas doses de EC purificado (cGtH), sendo a primeira de 0,07mg e a segunda de 0,35mg cGtH/kg de peso corporal, com intervalo de 11horas entre doses. Esses autores demonstraram uma drástica elevação na produção de 17α,20β-dihidroxy-4-pregnen-3-one (MIS) imediatamente antes da maturação meiótica concomitante à uma redução nos níveis de estradiol. O aumento da MIS durante esta fase é responsável pela indução da maturação final dos ovócitos (revisão Cnaani e Levavi-Sivan, 2008). Além disso, estes autores demonstraram que, durante o processo de ovulação, a mudanças na esteroidogênese só é obtida com doses fracionadas de EC, mas não com dose única. A mudanças na esteroidogênese foi posteriormente encontrada em peixes com ovulação bem sucedida em outras espécies, além da carpa, [*Seriola quinqueradiata* (Rahman *et al.*, 2001), *Oryzias latipes* e *Oreochromis niloticus* (Nagahama e Yamashita, 2008), entre outros] e passou a ser conhecido como um indicador de desova bem sucedida.

1.4 Diferenciação sexual em peixes de interesse para a piscicultura

A diferenciação do sexo gonadal em peixes ocorre dias, semanas ou

meses após o nascimento dos embriões (Devlin e Nagahama, 2002) e existe uma plasticidade na determinação do sexo fenotípico (Crews, 1996). Assim, a inversão sexual, amplamente utilizada em espécies de produção, direciona a formação de populações monosexo para o gênero que apresenta alguma vantagem zootécnica, normalmente para aquele que apresenta as melhores taxas de crescimento (Devlin e Nagahama, 2002). A inversão sexual vem sendo utilizada amplamente na aquicultura para obter diversos tipos de vantagens zootécnicas, tais como: as melhores taxas de crescimento nos machos (no gênero *Oreochromis* spp (Baras e Mélard, 1997)); melhores taxas de crescimento nas fêmeas (em diversas espécies de peixes migradores nativos como *Pseudoplatystoma reticulatum* (Wootton, 1998) e *Salminus brasiliensis* (Tos *et al.*, 2009; Bazzoli, 2003, entre muitos outros)). No *L. friderici* as fêmeas apresentam taxas de crescimento superiores à dos machos (Rêgo, 2008; Lopes *et al.*, 2000), fator este que pode ser aproveitado para sua produção em cativeiro.

Em teleósteos, a determinação do momento ontogênico do início da diferenciação gonadal, também chamado de período lábil, é necessária, pois é neste momento que as gônadas em formação estão susceptíveis à ação de agentes exógenos para inversão sexual como exposição à temperatura elevada ou baixa e indução hormonal (Blázquez *et al.*, 1998 e 2001; Piferrer, 2001). Portanto, o ponto de partida para o desenvolvimento de protocolos de inversão sexual é determinar histologicamente em que período, após o nascimento, as gônadas podem ser evidenciadas histologicamente pela primeira vez.

Em peixes, sabe-se que atividade de uma enzima chave, conversora de

esteroides gonadais, conhecida como aromatase, pode estar alterada em larvas em desenvolvimento quando se eleva a temperatura da água (Devlin e Nagahama, 2002). Na maioria dos peixes teleosteos investigados, até o momento, o gene que codifica a aromatase é um gene duplicado, originando dois genes diferentes (isoformas), nomeadas *cyp19a1a* e *cyp19a1b* (revisão em Sheng e Wang, 2014). O gene *cyp19a1a* é conhecido como "aromatase gonadal" ou " aromatase ovariana" (também referida como *p450aromA*, *cyp19a* ou *cyp19a1*), uma vez que é expresso principalmente na diferenciação gonadal e em adultos de peixes teleósteos. O gene *cyp19a1b,* conhecido como "aromatase neural" ou "aromatase cerebral" (também referida como *p450aromB*, *cyp19b* ou *cyp19a2*), é altamente expresso no cérebro de espécies de teleósteos do sexo masculino e feminino, no entanto, diferenças na expressão relacionada com o dimorfismo sexual durante a diferenciação do sexo gonadal não têm sido demonstradas (revisão em Sheng e Wang, 2014).

Dessa forma, a temperatura influencia o mecanismo da enzima aromatase (*cyp19a1a*), que catalisa a transformação de andrógenos para estrógenos (D'Cotta *et al.*, 2001). Portanto, em linhas gerais verifica-se que a ação da temperatura sobre a determinação sexual está frequentemente associada à modulação da atividade da enzima aromatase, porém os mecanismos parecem ser espécie-específico, bem como o emprego do uso de baixa ou alta temperatura na determinação do sexo fenotípico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente o desempenho reprodutivo de casais de *L. friderici* induzidos com extrato bruto de hipófise de

carpa (EC) e hormônios liberador de gonadotrofina análogo ao de mamífero associado à metoclopramida (mGnRHa + MET), em doses convencionais e reduzidas. Além disso, tivemos como objetivo secundário determinar o período de início de diferenciação gonadal e a proporção sexual de *L. friderici* dos 50 aos 240 dias após a eclosão (DAE) mantidas em caixas de água em temperaturas de 25 e 29ºC.

2.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente as taxas de desova, fertilização e eclosão das matrizes de *L. friderici* induzidas com EC e mGnRHa + MET, em doses convencionais e reduzidas.
- Determinar a eficácia dos protocolos de reprodução induzida com EC e/ou mGnRHa + MET na obtenção de embriões viáveis.
- Determinar o início do desenvolvimento gonadal e proporção sexual em *L. friderici* mantidas em água a 25 e 29ºC.
- Avaliar a influência dessas temperaturas (25 e 29ºC) nas taxas de comprimento padrão (CP), peso corporal (P), sobrevivência e proporção sexual.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho AA, Júlio Júnior HF, Gomes LC, Bini LM, Agostinho CS. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna In: Vazzoler AEAM; Agostinho AA; Hahn NS (Ed.). A Planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá: EDUEM, cap.II.4, p.179-208, 1997.

Albrecht MP, Caramaschi EP. Feeding Ecology of Leporinus friderici (Teleostei; Anostomidae) in the Upper Tocantins River, Central Brazil, before and after Installation of a Hydroelectric Plant. Stud Neotrop Fauna Environ. 38(1):33-40, 2003.

Andrade DR, Vidal Jr MV. Novas observações sobre a desova induzida do piau-vermelho (Leporinus copelandii), STEINDACHNER, 1875). In: Encontro da Associação Mineira de Aquicultura, 9, Belo Horizonte, Anais, p.31. 1991.

Andrade DR, Souza GAP, Júnior MVV et al. Morfometria como instrumento da estimação da fecundidade de fêmeas de piau-vermelho (Leporinus copelandii), na bacia do Baixo Rio Paraíba do Sul. Revista ceres, Viçosa, MG. 52(302):467-479, 2005.

Baras E, Mélard C. Individual growth patterns of juvenile Nile tilapia Oreochromis niloticus(L.): emergence and dynamics of sexual growth dimorphism. In: Fitzsimmons, K. (Ed.), Tilapia Aquaculture. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 106:169-177, 1997.

Baroiller JF, Guigen Y, Fostier A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. Cellular Molecular Life Sciences. 55:910-931, 1999.

Bazzoli N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: Godinho, H.P.; Godinho, A.L.(Eds.). Águas, peixes e pesca no São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: Editora PUC Minas, CNPq/PADCT CIAMB III. p.273-288, 2003.

Bizzotto PM. Trânsito de peixes na escada da UHE–Igarapava, Rio Grande, Alto Paraná. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte. 52p, 2006.

Blázquez M, Zanuy S, Carillo M et al. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.). J Exp Zool, 281(3):207-216, 1998.

Blázquez M, Zanuy S, Carrillo M. et al. Critical period of androgen – inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. Journal of Fish Biology.58:342-358, 2001.

Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology. 165, 535–548, 2010.

Brooks S, Tyler CR, Sumpter J. Egg quality in fish: what makes a good egg? Reviews in fish and fisheries. 7: 387-416, 1997.

Buchet V, Coquard E, Sévère A, Barone H. Influence of tank volume on vitellogenesis and spawning performances in sea bass Dicentrarchus labrax L., Aquaculture Research. 39: 420-426, 2008.

Carolsfeld J, Ramos SM, Ormanezi R, et al. Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (Piaractus mesopotamicus). Aquaculture. 74:49-55, 1988.

Cnaani A, Levavi-Sivan B. Sexual Development in Fish, Practical Applications for Aquaculture. Sex Dev.3(2-3):164-75, 2009.

Costa APR, Andrade DR, Vidal Jr MV et al. Indicadores quantitativos da biologia reprodutiva de fêmeas de piau-vermelho no Rio Paraíba do Sul. Pesq Agropec Bras. 40:789-795, 2005.

Crews D. Temperature-dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. Zool. Sci. 13:1-13, 1996.

Criscuolo-Urbinati ER, Kuradomi Y, Urbinati EC, Batlouni SR. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (Piaractus mesopotamicus). Theriogenology, 78: 2087 – 2094, 2012.

D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y et al. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia Oreochromis niloticus. Mol Reprod Dev, 59:265-276, 2001.

Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208:191-364, 2002.

Donaldson EM, Hunter GM. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Edits). Fish physiology. New York: Academic Press. 9:351-403, 1983.

Durães R, Pompeu PS, Godinho AL. Alimentação de quatro espécies de Leporinus (Characiformes, anostomidae) durante a formação de um reservatório no sudeste do brasil. Iheringia. 90:183-191, 2001.

Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. The gonadal steroids. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. (eds.). Fish Physiology. New York, US: Academic Press, v. 9a, p. 277-372, 1983.

Garavello JC. Revisão taxonômica do gênero Leporinus SPIX, 1829 (Ostariophysi, Anostomidae). Tese (USP), São Paulo, Brasil, 1979.

Godoy MP. Peixes do Brasil. Piracicaba: Ed. Franciscana, 1975.

Guraya SS. Comparative cellular and molecular biology of testis in vertebrates. Trends in endocrine, paracrine and autocrine regulation of structure and functions. Enfield, UK: Science Publishers Incorporated, 91p., 2001.

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

Harvey BJ, Hoar WS. The theory and pratice of induce breeding in fish. International Development Research Center - IDRC, (TS21e), 1979.

Harvey BJ. Carolsfeld. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa, International Development Research Centre. 144 p. 1993.

Kirschbaum F. Reproduction of weakly electric teleosts: just another example of convergent development. Environm Biol Fish.10:3-14,1984.

Korf, HM.The pineal organ. In: Reinecke, M.,Zaccone, G., Kapoor, B.G. (eds). Fish Endocrinology. Vol 2. USA: Science Publishers. 2006

Levavi-Sivan B, Vaiman R, Sachs O, Tzchori I. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (Bidyanus bidyanus). Aquaculture. 229(1-4):419-431, 2004.

Lopes CA, Benedito-Cecilio E, Agostinho AA. The reproductive strategy of Leporinus friderici (Characiformes, Anostomidae) in the Paraná River basin: effect of reservoirs. Rev Bras Biol, 60(2):255-266, 2000.

Lopes JP, Leal ALG. Desova induzida em Piau-de-vara Schizodon fasciatus spix & agassiz, 1829 para propagação artificial. Rev. Bras. Eng. Pesca. 5(1): XIV-XX, 2010.

Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs

are formed. General and Comparative Endocrinology 165:367-389, 2010.

Menezes RS. Hipofisação de peixes na prática de piscicultura. Fortaleza: Ministério da Agricultura, Seção de fomento Agrícola do Ceará, 40p, 1954.

Mylonas CC, Magnus Y, Gissis A, Klebanov Y, Zohar Y. Application of controlled-release, GnRHa-delivery systems in commercial production of white bass x striped bass hybrids (sunshine bass), using captive broodstocks. Aquaculture 140, 265-280, 1996.

Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen Comp Endocrinol. 165:516-534, 2010.

Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish. Dev. growth differ.. 50:195-219, 2008.

Nakamura M, Kobayashi T, Chang XT, Nagahama Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. Journal of Experimental Zoology, New York, US. 281:362-372, 1998.

Nomura H. Biologia da piava, Leporinus copelandii Steindachner, 1875 do Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo. Tese de Doutoramento, III + 79 pp., UNICAMP, Campinas, 1970.

Okumura S, Okamoto K, Oomori R, Sato H, Nakazono A. Improved fertilization rates by using a large volume spawning tank in red spotted grouper (Epinephelus akaara). Fish Physiol. Biochem. 28:515-516, 2003.

Patiño R, Sullivan CV. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiol Biochem. 26, 57-70, 2002.

Peter RE, Yu KL. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basics applied aspects. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 7:173-197, 1997.

Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, 197: 229-281, 2001.

Prötner HO. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comparative Biochemistry and Physiology A 132, 739-761, 2002.

Rahman MA, Ohta K, Chuda H, Nakano S, Maruyama K, Matsuyama M. Gonadotropin-induced steroidogenic shift towards maturation-inducing hormone in Japanese yellowtail during final oocyte maturation. Journal of Fish Biology. 58(2):462-474, 2001.

Rêgo ACL, Pinese OP, Magalhães PA et al. Relação peso-comprimento para Prochilodus lineatus (Valenciennes,1836) e Leporinus friderici (Bloch,1794) (Characiformes) no reservatório de Nova Ponte – EPDA de Galheiro, rio Araguari, MG. Rev Bras Zoo,10(1):13-21, 2008.

Rezende APS, Alves CBM, Silva MOB. Avaliação da maturação gonadal e indução da reprodução de peixes coletados no Rio Grande, a jusante da URE Itutinga, MG. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, v. 48, supl. I, p. 39-46, 1996.

Sanches PV, Baumgartner G, Bialetzki A, et al. Caracterização do desenvolvimento inicial de Leporinus friderici (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná, Brasil. Acta Scientiarum, Maringá, 23(2):383-389, 2001.

Schulz RW, França LR, Lareyre JJ, Legac F, Chiarini-Garcia H, Nóbrega RH, Miura T. Spermatogenesis in fish. General and comparative endocrinology. 165: 390-411, 2010.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr. Rev. 15:342-355, 1994.

Suplicy FM (2007) Freshwater fish seed resources in Brazil. In: Bondad-Reantaso MG, editor. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, No. 501, FAO, Rome. pp. 129-143.

Suzuki HI. Variações na morfologia ovariana e no desenvolvimento do folículo de espécies de peixes teleósteos na bacia do rio Paraná, no trecho entre a foz do rio Paranapanema e a do rio Iguaçu. Dissertação (Mestrado) - UFPR, 140p, 1992.

Tos CD, Gomes LC, Agostinho AA, Batista RP. Age, growth, mortality and yield per recruit of the dourado Salminus brasiliensis, Corumbá Reservoir, Goiás State, Brazil. Neotrop ichthyol, 7(2):223-230, 2009.

Vaz MM, Torquato VC, Barbosa NDC. Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande. Belo Horizonte, CEMIG e CETEC, 144p, 2000.

Von Ihering R, Azevedo P. A desova e a hipofisação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. Arch. Inst. Biol. 7:107-18, 1936.

Wootton RJ. Ecology of teleosts fishes. London, Chapman and Hall. 404p, 1998.

Woynarovich E, Horváth L. A propagação artificial de peixes de águastropicais: manual de extensão. Brasília, FAO/ CODEVASF/CNPQ, 225p, 1983.

Zaniboni-Filho E, Barbosa NDC. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. Rev Bras Biol. 56:655-659, 1996.

Zaniboni-Filho E, Weingartner M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. Rev. bras. reprod. anim. Belo Horizonte. 31:367-373, 2007.

Zohar Y, Mylonas CC. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture. 197; 99-136, 2001.

MANUSCRITO I

Obtenção de embriões viáveis de *Leporinus friderici* com doses convencionais e reduzidas de extrato bruto de hipófise de carpa e mGnRHa.

RESUMO

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido desenvolvidos visando subsidiar a substituição do extrato bruto de hipófise de carpa (EC) por produtos sintéticos para reprodução induzida de peixes migradores. Contudo, as espécies apresentam particularidades que impedem o estabelecimento de um protocolo geral. No *Leporinus friderici* essas particularidades são acentuadas, pois a espécie aparentemente não responde adequadamente a doses convencionais de EC. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução do processo meiótico e o desempenho reprodutivo de matrizes de *L. friderici* induzidas com doses convencionais e relativamente baixas de EC e de GnRH análogo ao de mamífero associado à metoclopramida (mGnRHa + MET). O estudo foi conduzido por meio de dois experimentos simultâneos. No primeiro foi utilizado o EC em doses de 0,5 e 5,5mg/Kg (doses convencionais) e de 0,5 e 1,0mg/Kg (doses reduzidas). No segundo foi utilizado dose única de 40µg de mGnRHa + 20mg de MET/Kg (dose convencional) e duas doses de 4µg + 2mg; e 8µg + 4mg, de mGnRHa + MET/Kg (doses reduzidas). Observamos que 80% e 100% das matrizes induzidas respectivamente com dose convencional e reduzida de EC desovaram, no entanto, embriões viáveis foram obtidos apenas com dose reduzida. As matrizes induzidas com doses reduzidas de EC apresentaram taxa de fertilização (TF) e de eclosão (TE) respectivamente de 74,9 ± 8,3% e 85,0 ± 5,8%, enquanto que doses convencionais de EC propiciaram TF=1,2 ± 0,9% e TE=0%. Observamos que matrizes induzidas com mGnRHa + MET, com dose convencional ou reduzida, apesar de ovularem, não geraram embriões viáveis. Concluindo, neste estudo apenas o uso de EC em doses reduzidas proporcionou um desenvolvimento adequado dos ovócitos originando embriões viáveis. Observamos que esta espécie apresenta comportamento diferente da maioria das espécies migradores sul-americanos já estudadas, pois responde satisfatoriamente à doses reduzidas de EC, mas não às doses convencionais. É possível que a espécie apresente alguma toxicidade provocada pelo excesso de GnRH, hormônio luteinizante ou aos esteroides gonadais, os quais seriam transmitidos da fêmea para os embriões antes do processo de ovulação, provocando a morte dos mesmos. Esta particularidade deve ser mais bem explorada em futuras abordagens, pois tem implicações diretas na produção de alevinos desta espécie e pode ajudar a mitigar problemas similares encontrados com outras espécies de peixes migradores, produzidos em cativeiro.

Palavras-chave: piau-três-pintas; reprodução; peixamento; semi-natural; dose eficaz.

ABSTRACT

In recent years, several studies have been developed to support the replacement of the crude carp pituitary extract (EC) by synthetic products for induced reproduction of migratory fish. However, species have characteristics that prevent the establishment of a general protocol. In *Leporinus friderici* these characteristics are accentuated because the species apparently not adequately respond to conventional doses of EC. In this context, the aim of this study was to evaluate the evolution of the meiotic process and the reproductive performance of *L. friderici* arrays induced with conventional doses and relatively low EC and mammalian GnRH analogue associated with metoclopramide (mGnRHa + MET). The study was conducted by means of two simultaneous experiments. In the first EC was used in doses of 0.5 and 5.5 mg / kg (conventional dose) and 0.5 and 1.0 mg / kg (lower dose). In the second was used for single dose of 40μg + 20mg mGnRHa MET / kg (standard dose) and two doses of 4μg +2mg; and 8μg + 4mg of mGnRHa + MET / kg (lower doses). We observed that 100% and 80% respectively of the broodstock induced with conventional and low dose at EC spawned, however, viable embryos were obtained only at lower dose. The broodstock induced with lower doses of EC showed fertilization rate (TF) and hatching (TE) respectively 74.9 ± 8.3% and 85.0 ± 5.8%, while conventional doses of EC have led TF = 1.2 ± 0.9% and TE = 0%. We note that broodstock induced with mGnRHa + MET, with conventional or lower dose, although ovulate, did not generate viable embryos. In conclusion, this study only the use of EC in small doses provided an adequate development of the oocytes giving viable embryos. We note that this species has different behavior of most South American migratory species studied, since not respond to lower doses of EC, but not at conventional doses. It is possible that the species has some toxicity caused by excess GnRH, luteinizing hormone or the gonadal steroids, which would be transmitted from the female to the embryos before the ovulation process, killing them. This peculiarity should be further explored in future approaches as it has direct implications for the production of seed of this species and can help mitigate similar problems found with other species of migratory fish, produced in captivity.

Keywords: piau-três-pintas; reproduction; stocking; semi-natural; effective dose.

1. INTRODUÇÃO

O *L. friderici* é uma espécie reofílica, ou seja, necessita da corrente fluvial para ter acesso a um local para reprodução e de outro para alimentação, crescimento e engorda (Nomura, 1970). A espécie apresenta hábitos migratórios (Godoy, 1975), com período reprodutivo de novembro a fevereiro, e fecundação externa (Garavello, 1979). A espécie é importante para a pesca comercial e de subsistência (Vaz *et al*., 2000), apresenta qualidade de carne elevada e aceitação para pesca esportiva (Andrade e Vidal, 1991). No entanto, há relatos de redução de estoques naturais devido à degradação ambiental e a pesca predatória (Andrade *et al*., 2005), aliado a isso o *L. friderici* está presente em rios que sofrem represamento (Agostinho *et al*., 1997; Durães *et al*., 2001; Albrecht *et al*., 2003; Bizzotto, 2006), prejudicando sua reprodução. Desta forma, em grande parte do território nacional, existe a procura de alevinos de *L. friderici* para aquicultura e programas de repovoamento de rios federais e reservatórios (Suplicy, 2007), visto que o Brasil consegue produzir pouco mais de 5 milhões de alevinos de *L. friderici* tentando suprir esses nichos de mercado, de acordo com os últimos registros datados do ano de 2005 (Suplicy, 2007).

Por se tratar de uma espécie reofílica, sua desova pode ser obtida em condições de cultivo mediante indução hormonal, assim como na maioria dos peixes reofílicos sul-americanos (Zaniboni-Filho e Weingart, 2007). No entanto, a aplicação de extrato bruto de hipófise (EC), na concentração total de 3,3 a 5,5 de EC /kg^{-1} de peso corporal (divididos em duas doses) (Von Ihering e Azevedo, 1936; Woynarovich e Horváth, 1983; Harvey e Carolsfeld, 1993; Zaniboni-Filho e Weingartner, 1997), ainda é administrada convencionalmente

nas fêmeas da maioria dos peixes reofílicos. A primeira dose acelera o desenvolvimento das gônadas e estimula a migração da vesícula germinal. A segunda dose, geralmente aplicada decorridas 12 a 24 horas da primeira, induz a quebra da vesícula germinal, ovulação e desova (Woynarovich e Horváth, 1983; Harvey e Carolsfeld, 1993; Zaniboni-Filho e Weingartner, 1997).

De forma geral, doses muito próximas das convencionais de EC (6,0mg.kg^{-1} de peso corporal, dividido em duas doses) propiciam embriões viáveis em diversos peixes sul-americanos [exemplo: *Leporinus macrocephalus* (Reynalte-Tataje *et al.*, 2001)*, Piaractus mesopotamicus* (Streit Júnior *et al.*, 2005)*, Rhamdia quelen* (Carneiro *et al.*, 2009) *e Leporinus piau* (Sampaio e Sato, 2009)]. No entanto, em nossos estudos preliminares (dados não divulgados), as doses convencionais mencionadas de EC não propiciaram a obtenção de embriões viáveis em *L. friderici*. Da mesma forma*,* Rezende *et al*. (1996) utilizando doses convencionais de EC (dose total de 4,4mg.kg^{-1}, dividida em duas doses) relataram ovulação bem sucedida, mas taxa de fertilização nula em *L. friderici*. Todavia, doses não usuais relativamente baixas de EC (0,5 e 1,0mg/Kg, com intervalo de 6 horas, ou seja, dose total de 1,50mg/Kg), foram eficazes na obtenção de embriões, assim como encontrado por Lopes e Leal (2010) em *Schizodon fasciatus.*

Neste contexto, o motivo de se usar normalmente duas e não uma dose de EC foi demonstrada na década de 1980 por Levavi-Zermonsky e Yaron (1986). Neste estudo, em carpa comum, utilizando o método de hipofisação convencional foi constatada a redução nas concentrações plasmáticas de 17β-Estradiol (E2) com concomitante elevação abrupta da concentração plasmática de 17α,20β-dihidroxy-4-pregnen-3-one (MIS) no plasma sanguíneo das fêmeas

imediatamente antes da maturação do ovócito. A mudança na esteroidogênese foi posteriormente associada com ovulação bem sucedida em outras espécies, além da carpa, [*Seriola quinqueradiata* (Rahman *et al.*, 2001), *Oryzias latipes* e *Oreochromis niloticus*) (Nagahama e Yamashita, 2008), entre outros] e passou a ser conhecida como um indicador de desova bem sucedida. No entanto, nada se sabe sobre a resposta dos ovários frente a doses convencionais ou não convencionais em espécies migradoras sul-americanas, tampouco no *L. friderici*. Portanto estas são informações-chave para se aprimorar e conhecer melhor o processo de reprodução induzida destas espécies.

Não obstante, a hipofisação ainda apresenta algumas limitações. O EC possui além do hormônio luteinizante (Lh), hormônios de crescimento, osmorreguladores e outros (Harvey e Hoar, 1979; Mylonas *et al.*, 2010), os quais podem prejudicar a reprodução. Uma alternativa para a indução à reprodução é o uso de hormônios sintéticos que atuam em um nível superior do eixo hipotálamo-pituitária-gônadas, proporcionando uma estimulação balanceada dos eventos reprodutivos. Os análogos de hormônios liberador de gonadotrofina (GnRHa) têm sido amplamente utilizados em muitas espécies de peixes (Mylonas *et al*., 2013). Estes hormônios apresentam alta similaridade estrutural com os GnRH endógenos (Lethimonier *et al*., 2004) e não representam uma ameaça a transmissão da doença, por ser de natureza sintética (Donaldson e Hunter, 1983). Além disso, podem ser usados em concentrações exatas e predefinidas (Zohar e Mylonas, 2001; Mylonas *et al.*, 2010). Um dos tipos de GnRHa utilizados em grande parte das pisciculturas Brasileiras é o GnRHa de mamífero (mGnRHa) em associação com a metoclopramida (MET), um inibidor de dopamina. Geralmente a dosagem

convencional de mGnRHa + MET é utilizada em dose única (~40µg de mGnRHa + 20mg de MET/Kg^{-1} de peso corporal) (Horvath *et al*., 1997; Targońska *et al*., 2010; 2011; Kayim *et al*., 2010).

Em espécies cultivadas principalmente em países do hemisfério norte, o uso de EC já foi substituído por produtos sintéticos mais seguros e eficientes, principalmente a base de GnRH em associação a um inibidor de dopamina (ID) (Peter *et al*., 1988; 1986; 1993; Trudeau e Peter, 1995; Yaron, 1995). Essas espécies respondem muito bem a protocolos de indução hormonal com produtos sintéticos a base de GnRH (Heyrati *et al*., 2007; Wang *et al.,* 2009; Sharaf, 2012). No entanto, em peixes migradores sul-americanos o uso efetivo de GnRH sintético para obtenção de embriões viáveis ainda permanece incerto. Nestas espécies, o uso destes produtos não tem se mostrado eficaz, uma vez que apesar de as fêmeas ovularem, as taxas de viabilidade de embriões são muito baixas ou próximas à zero [exemplo: *Rhamdia quelen* (Carneiro e Mikos, 2008), *Colossoma macropomum* (Acuña e Rangel, 2009); *Piaractus mespotamicus*, *Brycon orbygnianus* e *Prochilodus lineatus* (Paulino *et al.,* 2011)]. Mesmo em salmonídeos, mais bem estudados, tratamentos com GnRHa podem trazer redução na qualidade dos ovos [Mylonas *et al*. (1992), Taranger *et al*. (1992), Gillet *et al*. (1996), Olito *et al*. (2001), Mikolajczyk *et al*. (2005), Bonnet *et al*. (2007), Noori *et al*. (2010)].

Assim, visando sobrepujar os obstáculos encontrados para padronização do uso de GnRH em peixes tropicais de importância comercial, e conhecer alguns dos possíveis mecanismos envolvidos com a necessidade de uso, não usual, de doses reduzidas de EC no *Leporinus friderici*, neste estudo comparamos a evolução do processo de maturação final e ovulação utilizando

EC e mGnRHa + MET em doses convencionais e reduzidas. Tivemos como objetivo específico avaliar o potencial de cada tratamento em provocar a maturação final e ovulação (bem como as características deste processo) por meio de análises estereológicas de ovários pós-desova. Por fim, comparamos o desempenho reprodutivo de cada tratamento considerando a taxa de ovulação, e as taxas de fertilidade e eclosão obtidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Captura de reprodutores e matrizes

Matrizes e reprodutores selvagens foram coletados nas escadas de transposição de peixes, que liga montante à jusante das Pequenas Centrais Hidrelétricas de Palmeiras e Retiro, situadas no rio Sapucaí Mirim (entre os municípios de Guará e São Joaquim da Barra, SP). Para a formação do plantel foram utilizados redes de arrasto sem nós, malha de 50mm. Após a captura, o plantel foi transferido para viveiros de mantença, no Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP (Jaboticabal, SP), por meio de caixas de transportes com aeração. As matrizes e reprodutores foram aclimatados (por três meses), domesticados por 2 anos e marcados por meio de microchips AnimallTAG® (Korth RFID Ltda, São Carlos, SP). Esses reprodutores fazem parte de um projeto de repovoamento de peixes do rio Sapucaí Mirim, que visa à soltura de alevinos provenientes de cruzamentos dirigidos, objetivando a reposição de estoques naturais, preservando a variabilidade genética.

2.2 Peixes e manejo

Após a aclimatação e marcação, os peixes foram mantidos em viveiros escavados de 400m^3 (20m de largura X 10m de comprimento X 2m de profundidade) na densidade de ~0,2peixe/m^3. As matrizes e reprodutores foram

arraçoadas até a saciedade seis dias na semana, em duas porções, às 8:00 e às 17:00 horas, com ração comercial extrusada para peixes onívoros (composição: 12,0% de teor de umidade; 32,0% de proteína bruta, 4,5% de extrato etéreo, 9,0% de fibra, 3,5% de Cálcio, 6,0% de fósforo).

2.3 Parâmetros de qualidade da água.

Os parâmetros da água foram monitorados semanalmente, às 9:00 horas. Para isso, foi utilizado um oxímetro HI9146-10 (Hanna Instruments – Resolução: 0,01mg/L) para mensuração do oxigênio dissolvido; um medidor de pH HI98172 (Hanna Instrument - Acurácia: ± 0,1 pH) para mensuração do pH; e um condutivímetro HI98311 (Hanna Instruments – acurácia de 0,1µS/cm para condutividade e de 0,15ºC para temperatura) para mensuração da condutividade e temperatura.

2.4 Administração de hormônios

O EC utilizado neste estudo foi da marca Stoller Fisheries (Spirit Lake, Iowa, USA). O mGnRHa+ MET utilizado foi da marca Ovopel® (Interfish Ltd, Budapest, Hungary), cuja molécula de GnRHa apresenta as modificações D-Ala^{6},Pro^{9}-Net na sequência de aminoácidos. Cada pellet de Ovopel® continha em sua composição de 18 - 20µg de mGnRHa e 8 - 10mg de metoclopramida (Cejko et al., 2012). Para administrar as doses, o EC e o mGnRHa + MET (pellets de Ovopel®) foram macerados em cadinhos de cerâmica. Para auxiliar a maceração do mGnRHa + MET algumas gotas de glicerina liquida foram adicionadas. Os hormônios utilizados foram diluídos em soro fisiológico (0,9%) e aplicados na musculatura ventral. O volume injetado, independente da concentração de cada dose, foi de 0,5mL.kg^{-1} de peso corporal.

2.5 Reprodução induzida

No período reprodutivo, matrizes e reprodutores aptos à reprodução

foram escolhidos aleatoriamente para realização dos dois experimentos deste estudo (tabela 1). Os machos foram injetados com dose única de EC (na concentração de 1,0 mg.Kg^{-1}) no momento da segunda dose ou dose única nos tratamentos com EC e GnRHa + MET.

Tabela 1. Número, intervalo e concentração de doses *aplicadas nas fêmeas em cada tratamento de cada experimento.*

Experimento	Tratamento	Doses aplicadas (Kg^{-1} de peso corporal)		
		1ª dose	Intervalo (h)	2ª dose
EC	Doses convencionais	0,5mg	12	5,5mg
	Doses reduzidas	0,5mg	6	1,0mg
mGnRHa + MET	Dose convencional	40µg + 20mg	-	-
	Doses reduzidas	4µg + 2mg	6	8µg + 4mg

Extrato bruto de hipófise de carpa – EC; hormônios liberador de gonadotrofina análogo ao de mamífero associado à metoclopramida - mGnRHa + MET.

Os experimentos foram conduzidos em sistema semi-natural. Para isso, caixas d'água de volume total de 750L (preenchidas com aproximadamente 400L de água) foram utilizadas para cada tratamento conforme tabela 2.

Tabela 2. Número de caixas, proporção de machos e fêmeas e número total de peixes utilizados *em cada tratamento de cada experimento.*

Experimento	Tratamento	Caixas d'água (nº)	Macho:fêmea / caixa	Total (nº)	
				Fêmeas	Machos
EC	Doses convencionais	5	2 : 2	10	10
	Doses reduzidas	5	2 : 2	10	10
mGnRHa + MET	Dose convencional	5	2 : 2	10	10
	Doses reduzidas	3	2 : 2	6	6

Extrato bruto de hipófise de carpa – EC; hormônios liberador de gonadotrofina análogo ao de mamífero associado à metoclopramida - mGnRHa + MET.

2.6 Avaliação do desempenho reprodutivo

O desempenho reprodutivo das fêmeas em cada experimento foi avaliado inicialmente quanto às taxas de matrizes desovadas (TD = número de matrizes desovadas x 100/ número total de matrizes injetadas). Em seguida, avaliamos as taxas de fertilidade relativa (TFR = número de ovócitos liberados / peso corporal (g)), taxa de fertilização (TF = número de ovos viáveis x 100/

número total de ovos) e taxa de eclosão (TE = número de larvas eclodidas x 100/ número total de ovos) das fêmeas desovadas. Finalmente, avaliamos o período de latência, expressos em “horas-grau”, estimando o intervalo em horas entre a dose definitiva e a ovulação, nas fêmeas que desovaram, e multiplicamos o número de horas pela temperatura média desse intervalo.

Para o cálculo da TFR foi amostrado em cada experimento 1mL de ovócitos liberados de cada fêmea. Com isso, foi estimado a quantidade de ovócitos em 1ml, calculados em quintuplicatas, por fêmea. Desse modo, multiplicou-se o volume total (mL) de ovócitos liberados pelo número de ovócitos em 1mL. Para o calculo das TF e TE, um *pool* de ovos (20mL) das fêmeas desovadas, de cada experimento, foram transferidos para dez incubadoras conicas tipo funil de 7L. Dessa forma, foi possivel avaliar o percentual de ovócitos fertilizados até o fechamento do blastóporo, estimando em 200 ovos coletados, o número de ovos viáveis e não viáveis, em quintuplicata. Com o mesmo método, foi avaliado o percentual de larvas eclodidas momentos antes da eclosão.

2.7 Avaliação dos ovários pós-desova

Cinco matrizes, escolhidas aleatoriamente de cada tratamento, tiveram seus ovários coletados. Para isso, as fêmeas foram eutanasiadas com uma dose letal de benzocaína (20g diluída em 150mL de álcool 96,0ºGL e em 20L de água). Amostras da porção média dos ovários foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% por 24 horas. Em seguida, foram lavadas em solução tampão fosfato (0,05M e pH 7,2) e submetidas as técnicas histológicas de rotina para inclusão em historesina Histosec® (Merck, Darmstadt, DE). Posteriormente, obtivemos secções histológicas de 3µm, que foram coradas

com Hematoxilina-Eosina.

2.8 Análise descritiva e estereológica dos ovários

Uma avaliação descritiva foi realizada destacando-se as características dos ovócitos das fêmeas analisadas. Distintas fases de desenvolvimento foram classificadas pelas características histológicas. A frequência de densidade de volume ocupada pelos distintos tipos de ovócitos, folículos pós-ovulatórios e tecido intersticial foi determinada. Para isso, foram utilizados quatro campos microscópicos (objetiva 5x) da região média dos ovários (12 campos microscópicos por ovário). As contagens foram feitas em um *grid* com 352 pontos. Foram computados os pontos sobre as estruturas classificadas e calculadas suas frequências (n° pontos * 100/ total de pontos). Semelhante ao método utilizado por Criscuolo-Urbinati et al. (2012).

2.9 Determinação do diâmetro das células ovocitárias

Para a descrição do diâmetro dos ovócitos, 20 ovócitos de cada fase [pré-vitelogênico (PV); alvéolo cortical (AC); vitelogênico completo (VC); vitelogênico com vesícula germinativa migrada e não ovulada (GVBD) e atrésico (AT)] foram mensurados por ovário. Para isso foram utilizados um ovário de cada tratamento com EC (doses convencionais e doses reduzidas) e um ovário de cada tratamento com mGnRHa + MET (dose convencional e doses reduzidas). Para cada ovócito duas medidas de diâmetro foram registradas. Por fim foi calculada a média de todos os ovócitos registrados de cada fase. As mensurações foram realizadas com o auxilio de um microscópico binocular Leica DM4000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), equipado com o software Leica LAS v4.3.0 (Leica Microsystems).

2.10 Certificação do trabalho

Esse trabalho foi certificado, e documentado com número de protocolo

019375/13, por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal. A certificação foi adotada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Jaboticabal, SP.

2.11 Análise dos resultados

A análise estatística foi realizada utilizando o programa de computador STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Os pressupostos como a normalidade e homoscedasticidade foram testados. As variáveis como peso corporal, comprimento padrão e taxa de fecundidade relativa foram analisadas através do *Test t de Student*. As variáveis como taxa de fertilização e densidade de volume foram analisadas através do teste *Mann–Whitney U teste*. Os testes foram realizados com o nível de significância de $\alpha = 0,05$, com os dados expressos por média seguida do erro padrão (média ± EP).

3. RESULTADOS

3.1 Peixes, manejo e qualidade da água

Durante o período de aclimatação e domesticação nenhuma mortalidade e danos à higidez foram constatados nas matrizes e reprodutores. Os valores médios dos parâmetros de qualidade da água foram de 23,0 ± 1,2ºC de temperatura; 7,0 ± 0,9 de pH; 6,2 ± 0,3mg/L de oxigênio dissolvido; e 31,7 ± 2,3µS.cm de condutividade da água.

3.2 Características das matrizes e reprodutores

Os valores médios de peso corporal (g) e comprimento padrão (cm) dos peixes de cada tratamento foram similares em ambos os experimentos ($p>0,05$) (Tabela 3 e 4).

Tabela 3. *Valores médios de peso (g) e comprimento padrão (cm), de fêmeas e machos de L. friderici, submetidos a duas concentrações de extrato bruto de hipófise de carpa (EC). Doses convencionais (0,5 e 5,5mg.Kg^{-1}, intervalo de 12 horas); e doses reduzidas (0,5 e 1,0mg.Kg^{-1}, intervalo de 6 horas). Valores estão apresentados com média seguida de erro padrão (média ± EP).*

		Fêmeas			Machos		
Experimento 1	**Tratamento**	**Peso (g)**	**Comprimento padrão (cm)**	**Número amostral**	**Peso (g)**	**Comprimento padrão (cm)**	**Número amostral**
EC	Doses convencionais	803,0 ± 66,1 A	30,9 ± 0,6 A	10	293,5 ± 43,1 A	23,4 ± 0,9 A	10
	Doses reduzidas	656,7 ± 37,1 A	31,4 ± 0,4 A	10	291,9 ± 18,3 A	23,6 ± 0,6 A	10

Letras maiusculas diferentes indicam diferença estatistica ($p < 0,05$).

Tabela 4. *Valores médios de peso (g) e comprimento padrão (cm), de fêmeas e machos de L. friderici, submetidos a duas concentrações de hormônio liberador de gonadotropinas análogo de mamíferos associado com metaclopramida (mGnRHa + MET). Dose convencional (40µg de mGnRHa + 20mg de MET, dose única); e doses reduzidas (4µg e 2mg; e 8µg e 4mg de mGnRHa + MET, intervalo entre doses de 6 horas). Valores estão apresentados com média seguida de erro padrão (média ± EP).*

		Fêmeas			Machos		
Experimento 2	**Tratamento**	**Peso (g)**	**Comprimento padrão (cm)**	**Número amostral**	**Peso (g)**	**Comprimento padrão (cm)**	**Número amostral**
mGnRHa + MET	Dose convencional	625,5 ± 86,1 A	29,3 ± 1,1 A	10	270,5 ± 27,0 A	23,0 ± 0,7 A	10
	Doses reduzidas	458,2 ± 34,4 A	28,0 ± 0,9 A	6	263,0 ± 18,2 A	23,8 ± 0,4 A	6

Letras maiusculas diferentes indicam diferença estatistica ($p < 0,05$).

3.3 Reprodução induzida e desempenho reprodutivo

No experimento 1, os valores médios de horas-grau, TF e TE das matrizes induzidas com doses reduzidas de EC foram superiores aos induzidos com doses convencionais (*p<0,05*). A TD foi de 80% em doses convencionais e de 100% em doses reduzidas (Tabela 5). No experimento 2, todos os valores médios foram similares (*p>0,05*), com exceção dos valores de horas-grau que foram menores em matrizes induzidas com doses reduzidas em relação a indução com doses convencionais (*p<0,05*). A TD foi de 70% em dose convencional e de 50% em doses reduzidas (Tabela 6).

Tabela 5. *Desempenho reprodutivo de fêmeas de L. friderici submetidos a duas concentrações de extrato bruto de hipófise de carpa (EC). Doses convencionais (0,5 e 5,5mg.Kg^{-1}, intervalo de 12 horas); e doses reduzidas (0,5 e 1,0mg.Kg^{-1}, intervalo de 6 horas). Valores estão apresentados com média seguida de erro padrão (média ± EP).*

Experimento 1	Tratamento	TD (%)	TFR	Horas-grau	TF (%)	TE (%)
EC	Doses convencionais	80	110,4 ± 21,2 A	254,0 ± 6,9 A	1,2 ± 0,9 A	0
	Doses reduzidas	100	146,8 ± 26,1 A	153,5 ± 6,6 B	74,9 ± 8,3 B	85,0 ± 5,8

TD: taxas de desova das matrizes; TFR: taxa de fecundidade relativa; TF: taxa de fertilização; TE: taxa de eclosão. Valores médios ± erro padrão. Letras maiusculas diferentes indicam diferença estatistica ($p < 0,05$).

Tabela 6. *Valores médios de peso (g) e comprimento padrão (cm), de fêmeas e machos de L. friderici, submetidos a duas concentrações de hormônio liberador de gonadotropinas análogo de mamíferos associado com metaclopramida (mGnRHa + MET). Dose convencional (40µg de mGnRHa + 20mg de MET, dose única); e doses reduzidas (4µg e 2mg; e 8µg e 4mg de mGnRHa + MET, intervalo entre doses de 6 horas). Valores estão apresentados com média seguida de erro padrão (média ± EP).*

Experimento 2	Tratamento	TD (%)	TFR	Horas-grau	TF (%)	TE (%)
mGnRHa + MET	Dose convencional	70	59,4 ± 21,5 A	258,1 ± 4,0 A	0,8 ± 0,5 A	0
	Doses reduzidas	50	52,9 ± 23,9 A	158,6 ± 0,0 B	0,9 ± 0,0 A	0

TD: taxas de desova das matrizes; TFR: taxa de fecundidade relativa; TF: taxa de fertilização; TE: taxa de eclosão. Valores médios ± erro padrão. Letras maiusculas diferentes indicam diferença estatistica ($p < 0,05$).

3.4 Análise descritiva e morfometria dos ovários

As células ovocitárias foram classificadas e descritas, de acordo com a tabela 7 e Figura 1, em: ovócitos pré-vitelogênicos (PV), alvéolo cortical (AC), vitelogênico completo (VC), vitelogênico com vesícula germinativa migrada e não ovulada (GVBD), folículo pós-ovulatório (PO) e atrésico (AT).

Tabela 7. *Classificação e descrição histológica das fases de desenvolvimento das células ovocitárias de L. friderici.*

Classificação dos Ovócitos	Descrição Histológica
Pré-vitelogênico (PV) Diâmetro: 270,1± 8,8µm Figura 1A	Os ovócitos nesta fase eram de tamanho reduzido com núcleo na posição central e continham nucléolos na posição periférica. O citoplasma se apresentava basófilo.
Alvéolo Cortical (AC) Diâmetro: 478,4±25,0µm Figura 1B	Estas células eram maiores em relação à fase anterior. O núcleo, também maior, apareceu na posição central com nucléolos dispostos na posição periférica. O citoplasma adquiriu maior volume e, em sua periferia, surgiram os alvéolos corticais.
Vitelogênico completo (VC) Diâmetro: 692,5±35,9 µm Figura 1C	Nesta fase, o ovócito apresentou volume citoplasmático aumentado em relação ao AC, mas ainda ocorreram vesículas corticais na periferia. A vesícula germinativa estava na posição central ou migrada. O citoplasma se apresentava preenchido por vesículas de vitelo proteico.
Vitelogênico com vesícula germinativa migrada e não ovulada (GVBD) Diâmetro: 784,3 ± 29,4µm Figura 1D	Estes ovócitos apresentavam o citoplasma preenchido por grânulos de vitelo com aspecto desorganizado e fundidas umas às outras. Na periferia celular se encontrava uma fina camada de alvéolos corticais e a vesícula germinativa rompida.
Folículo pós-ovulatório (PO) Figura 1E	Estrutura remanescente nos ovários, formada pelas camadas foliculares e teca, após a ovulação. Estas estruturas eram enoveladas com formato diverso e irregular.
Atrésico (AT) Diâmetro: 345,6±26,4 µm Figura 1F	Todas as fases do desenvolvimento ovocitário apresentaram células em atresia, porém estes foram predominantemente encontrados na fase vitelogênica. Estas células apresentavam contorno disforme e irregular e estrutura interna desorganizada.

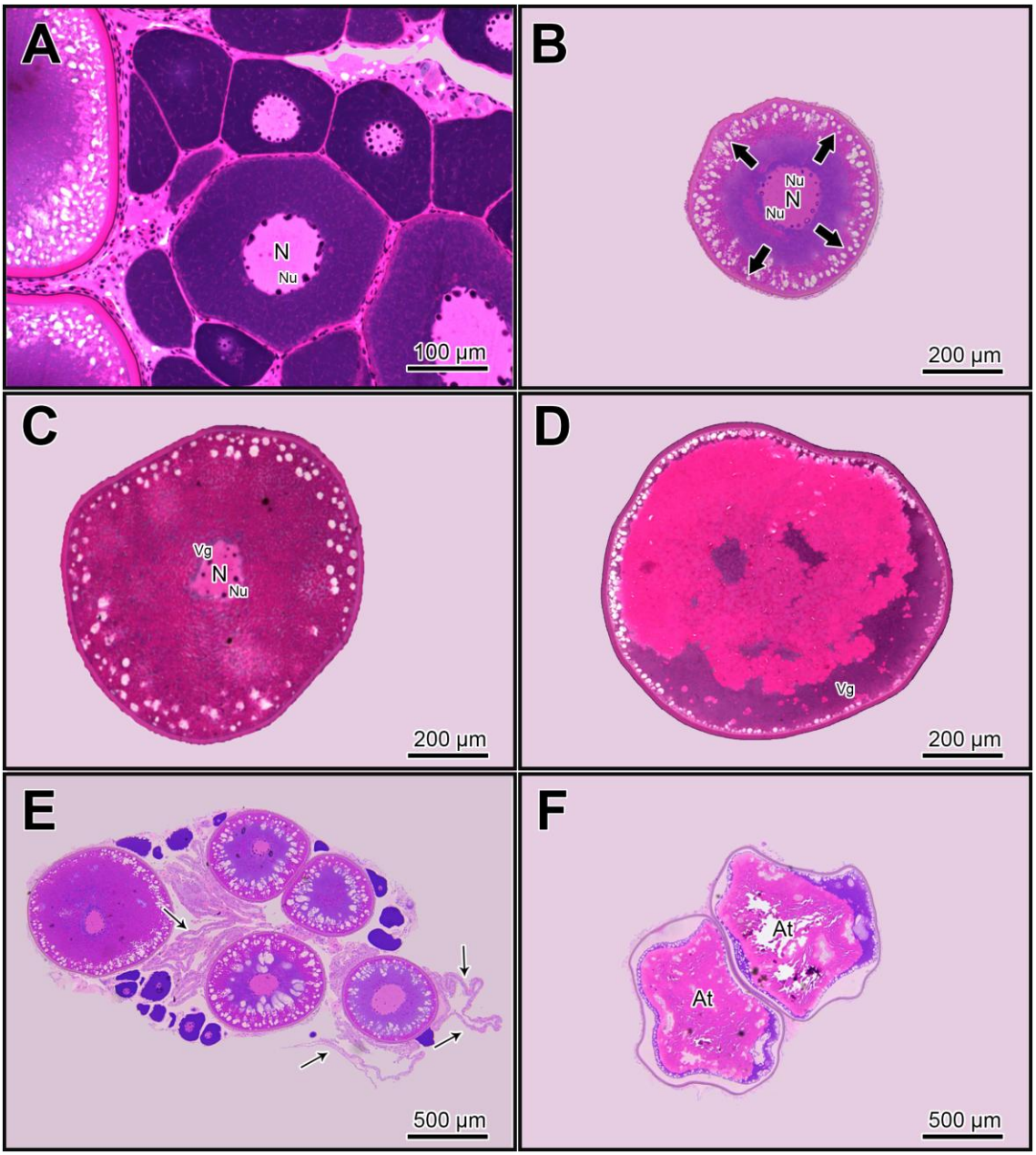

Figura 1. Fotomicrografias de secções histológicas de ovário de *Leporinus friderici* submetidos à indução hormonal. A: Pré-vitelogênico (PV); B: Alvéolo cortical (AC); C: Vitelogênico completo (VC); D: Vitelogênico com vesícula germinativa migrada e não ovulada (GVBD); E: Folículo pós-ovulatório (PO); F: Atrésico (AT). Destacados: núcleo (N); nucléolos (Nu); alvéolos corticais (seta espessa); vesícula germinativa rompida na periferia da célula (Vg); estrutura remanescente formada pelas camadas foliculares e teca (setas delgadas); células em atresia (At).

A análise descritiva da densidade de volume dos ovócitos do experimento 1 está representada pela Figura 2. Os valores médios de GVBD foram significativamente superiores ($p<0,05$) em matrizes induzidas com doses convencionais de EC (~69%), em relação as matrizes induzidas com doses reduzidas (~9%). No entanto, os valores médios de PV, AC, VC e TI foram

significativamente menores (~7 e ~5%; ~1 e ~9%; 27 e 33%; 4 e 6%, doses convencionais e reduzidas, respectivamente) (*p<0,05*).

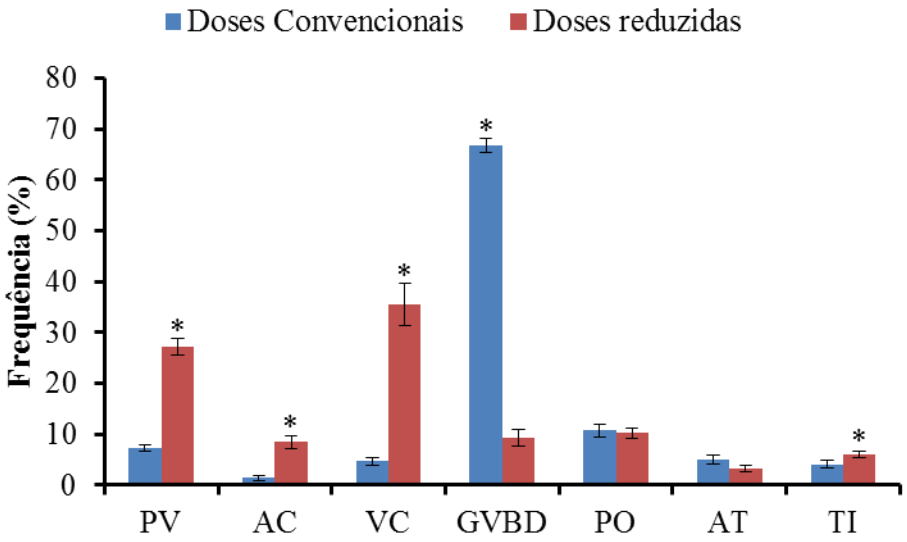

Figura 2. Frequência de ovócitos (%) de *L friderici* submetidos a duas concentrações de extrato bruto de hipófise de carpa (EC). Doses convencionais (0,5 e 5,5mg.Kg^{-1}, intervalo de 12 horas); e doses reduzidas (0,5 e 1,0mg.Kg^{-1}, intervalo de 6 horas). PV - Pré-vitelogênico; AC - Alvéolo Cortical; VC - Vitelogênico completo; GVBD - Vitelogênico com vesícula germinativa migrada e não ovulada; PO - Folículo pós-ovulatório; AT - Atrésico; e TI - tecido intersticial. Asteriscos indicam diferença estatistica (*p < 0,05*).

No experimento 2, o mesmo perfil de frequência de densidade de volume de AC, VC e PO foi observado em matrizes induzidas com mGnRHa + MET, em dose convencional e doses reduzidas, respectivamente (Figura 3) (p>0,05). Os valores médios de PV e GVBD foram significativamente superiores (~16 e ~11%; e ~66 e ~60%, em dose convencional e doses reduzidas, respectivamente) (*p<0,05*). No entanto, os valores médios AT e TI foram significativamente menores (~4 e ~8%; e ~3 e ~9%, doses convencionais e reduzidas, respectivamente) (*p<0,05*).

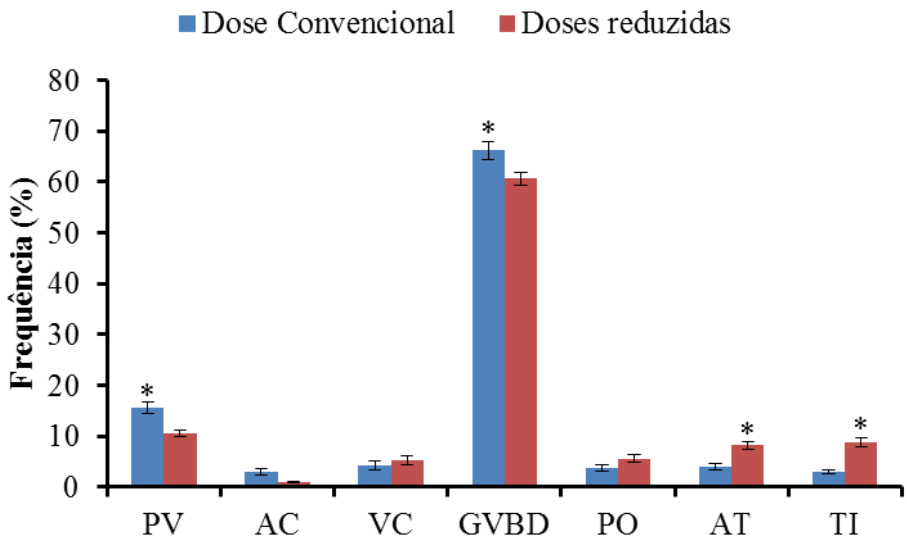

Figura 3. Frequência de ovócitos (%) de *L friderici* submetidos a duas concentrações de hormônio liberador de gonadotropinas análogo de mamíferos associado com metaclopramida (mGnRHa + MET). Dose convencional (40µg de mGnRHa + 20mg de MET, dose única); e doses reduzidas (4µg e 2mg; e 8µg e 4mg de mGnRHa + MET, intervalo entre doses de 6 horas). PV - Pré-vitelogênico; AC - Alvéolo Cortical; VC - Vitelogênico completo; GVBD - Vitelogênico com vesícula germinativa migrada e não ovulada; PO - Folículo pós-ovulatório; AT - Atrésico; e TI - tecido intersticial. Asteriscos indicam diferença estatistica ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos os efeitos das doses convencionais (doses usualmente aplicadas em espécies reofílicas) e doses relativamente baixas (doses reduzidas) em matrizes aptas de *L. friderici,* induzidas com EC e mGnRHa + MET, sobre o processo de maturação final, ovulação e desempenho reprodutivo. As doses convencionais de EC aqui testadas não permitiram obtenção de progênie viável. Por outro lado, doses não usuais, relativamente baixas de EC, foram adequadas para a espécie. Em relação às doses de mGnRHa + MET, tanto a dose convencional quanto as doses reduzidas não propiciaram a obtenção de embriões viáveis, apesar de promoverem a ovulação.

Analisando as doses convencionais de EC, as quais resultam em embriões viáveis na maioria das espécies reofílicas brasileiras, observamos que para o *L. friderici* estas se associaram com elevada mortalidade de

embriões, apesar de terem sido satisfatórias para o processo de ovulação. Possivelmente, a intensidade na secreção de hormônios em respostas a doses convencionais de EC no *L. friderici* tenha provocado a mortalidade de embriões desta espécie. Neste cenário, já foi demonstrado que hormônios reprodutivos do plasma materno são transferidos aos ovos (Brown e Berna 1989; Schreck *et al.*, 1991; Hwang *et al.*, 1992; Mylonas *et al*., 1994), os quais, desbalanceados, são potenciais causadores de mortalidade de embriões em peixes. Há relatos de níveis de E2 e MIS superiores em ovos não viáveis em relação a ovos viáveis (Feist *et al*.,1990). Dessa forma, é possível que alguma alteração no balanço desses hormônios tenha ocorrido em resposta a doses convencionais, alterando a transferência fisiológica materna desses hormônios aos ovos, causando sua morte.

Da mesma forma, as doses convencionais de EC e as doses convencionais e reduzidas de mGnRHa + MET podem ter prejudicado o desenvolvimento do embrião. Um dos fatores que podem ter causado mortalidade embrionária é a elevada estimulação da hipófise pelo GnRH sintético (Billard *et al*., 1984; Crim e Glebe, 1984; Mylonas *et al*., 1992;Taranger *et al.*, 1992; Haraldsson *et al*., 1993; Gillet *et al*., 1996; Olito *et al.*, 2001; revisão em Zoar e Mylonas, 2001) e consequente transferência para os ovócitos. Sabidamente as formas sintéticas de GnRH possuem maior resistência contra a degradação enzimática e podem, neste estudo, ter provocado uma liberação mais intensa e prolongada de GtH (revisão em Zoar e Mylonas, 2001), causando efeitos deletérios, como baixa fertilidade, baixa eclosão e redução da qualidade dos ovos (Mylonas *et al*., 1992). Esses efeitos deletérios podem ser potencializados pela “dessensibilização” ou “baixa-

regulação" de sítios de ligação do receptor de GnRH de alta afinidade (Peter e Yu, 1997).

Ainda em relação à indução de *L. friderici* por mGnRHa + MET, observamos que tanto a dose convencional quanto as reduzidas não permitiram a produção de embriões viáveis. Dessa maneira, provavelmente a variação de aminoácido D-Ala^{6},Pro^{9}NEt-mGnRH utilizado nesse experimento seja muito efetivo na secreção de GtH em *L. friderici* (como abordado anteriormente) e ambas as doses aqui testadas podem ter sido excessivas. Estudos sobre a atividade estrutural de GnRH análogos demonstraram que uma determinada variante e posição de aminoácidos desse peptídeo pode se sobressair na potência em relação a outro análogo, resultando em liberação mais acentuada de GtH (Murthy *et al*., 1994; Peter *et al*., 1995; Lovejoy *et al*., 1995). Por exemplo, Habibi *et al.* (1992) demonstraram, a partir de fragmentos de pituitária de goldfish *in vitro*, que a presença do aminoácido triptofano na posição 7 do sGnRH nativo elevou a potência destes peptídeos na liberação de Lh. Assim sendo, são necessários estudos para encontrar uma dose suficiente que provoque a ovulação e que não seja tóxica para os embriões, possibilitando, desta forma, a comprovação da toxicidade no *L. friderici* a distintos tipos de hormônios, provocadas por doses elevadas de GnRH sintético. Informações sobre a toxicidade de matrizes, reprodutores e embriões de peixes migradores à GnRH sintético são incipientes, mas necessárias para padronizarmos a substituição do uso de EC por estas substâncias.

Aparentemente, as espécies migradoras sul-americanas apresentam sensibilidade a doses de GnRH sintéticas, ou seja, são passíveis de sofrer ações deletérias com doses de GnRH, mesmo abaixo das doses convencionais

[(concentrações de: ~20 $\mu g.kg^{-1}$ + 10 $mg.kg^{-1}$ de MET em *Rhandia quelen* (Carneiro e Mikos, 2008); ~20 $\mu g.kg^{-1}$ + 10 $mg.kg^{-1}$ de domperidona em *Colossoma macropomum* (Acuña e Rangel, 2009); entre outros]. De forma contrária, as espécies do hemisfério norte respondem bem a doses convencionais, nas concentrações aqui aplicadas, e ainda apresentam embriões viáveis em doses mais concentradas [(GnRH sintético, com a variação D-Ala^6,Pro^{9}NEt]-mGnRH, resultou em embriões viáveis nas concentrações de: 100 $\mu g.kg^{-1}$ em *Oncorhynchus mykiss* (Pankhurst e Tomas, 1998); 70$\mu g.kg^{-1}$ em *Oncorhynchus keta* (Park *et al*., 2007); 100 + 100 $\mu g.kg^{-1}$ em *Salmo trutta caspius* (Noori *et al*., 2010); 40 $\mu g.kg^{-1}$ + 20 $mg.kg^{-1}$ de MET em *Thymallus thymallus* (Szmyt *et al*., 2012); entre outros]. Desta forma, a mortalidade embrionária possivelmente ocorre em menor intensidade em espécies de regiões temperadas, tratadas com doses elevadas, comparada as nossas espécies, que podem facilmente provocar a morte, às vezes, em 100% dos embriões.

Em se tratando de reprodução induzida, o tempo estimado para a ovulação a partir do momento da indução (período de latência) é essencial para o planejamento da desova, seja para a pesquisa como para produção. Analisando o período de latência observamos associação das doses reduzidas com período de latência menor, com EC e mGnRHa + MET. No entanto, não houve associação do menor período de latência com obtenção de embriões viáveis no tratamento com mGnRHa + MET. Ressaltamos também que o tempo de resposta da ovulação de 153,5 ± 6,6 horas-grau com doses reduzidas de EC foi relativamente menor no *L. friderici* em relação aos obtidos em espécies congêneres [200-220 horas-grau para o *L. piau* (Sampaio e Sato, 2009), 202

horas-grau para o *L. macrocephalus* (Reynalte-Tataje *et al*., 2013) e 200-300 horas-grau para o *L. elongatus* (Sato *et al*., 2000)]. Estas observações apontam para intensas particularidades em espécies nativas de mesmo gênero, que por sua vez mostram a necessidade de mais estudos específicos e aprofundados para evoluções práticas e teóricas neste tema.

No experimento com mGnRHa + MET observamos que a dose convencional causou período de latência maior em relação as doses reduzidas. Neste contexto, Levavi-Sivan *et al*. (2004) demonstraram que a injeção de mGnRHa resulta em elevação mais duradoura de Lh no plasma se comparado à injeção de sGnRHa, em Perca prateada (*Bidyanus bidyanus*). Ainda de acordo com estes autores, a elevação mais intensa provocada por mGnRHa resultou em redução da fecundidade. Assim, é possível que a depuração metabólica mais lenta do mGnRHa + MET, ou dos hormônios “downstream” no eixo como o Lh (Goren *et al*., 1990, Levavi-Sivan *et al*., 2004), estejam envolvidos na morte dos embriões e no maior tempo de latência observados nas doses convencionais.

Por meio das analises estereológicas, verificamos que as doses convencionais de EC resultaram em grande porcentagem de ovócitos GVDB aderidos aos ovários, em relação às doses reduzidas. Esses dados são reflexos do número de fêmeas que não desovaram, assim como relatado por Hainfellner *et al*. (2012) e Criscuolo-Urbinati *et al*. (2012). Observamos também maior porcentagem de PV, AC e VC com doses reduzidas de EC. Esses dados demonstram a eficiência da dose reduzida de EC, visto que menos de 10% de GVBD ficou retido nos ovários, o que acabou resultando em percentuais

maiores das fases anteriores pelo maior volume destes em comparação com os PO.

Com relação às analises estereológicas dos peixes tratados com mGnRHa + MET verificamos a ocorrência de elevado percentual de ovócitos GVDB aderidos aos ovários em ambas os tratamentos. Observamos percentual superior de GVDB nos ovários do tratamento com doses convencionais, e paralelamente percentuais superiores de AT com doses reduzidas. Dessa forma, podemos sugerir que tanto as doses convencionais quanto as doses reduzidas culminaram em falhas reprodutivas na maturação final e ovulação, prejudicando a obtenção de embriões viáveis.

Concluindo, esse estudo demonstrou que o *L. friderici* induzidos com doses convencionais de EC e convencionais e reduzidas de mGnRHa + MET ocasionaram vários problemas reprodutivos, prejudicando a viabilidade dos embriões. Por outro lado, doses reduzidas de EC foram promissoras na obtenção de embriões viáveis no *L. friderici* com baixa presença de GVBD aderidos aos ovários. É possível que a espécie apresente elevada toxicidade aos protocolos empregados. As razões para este comportamento devem ser mais bem exploradas em futuras abordagens, pois tem implicações diretas na produção de alevinos desta espécie e podem ajudar a mitigar problemas similares encontrados com outras espécies de peixes migradores produzidos em cativeiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña JJA, Rangel JLH. Effects of hypophyseal extract of common carp and the analog of the GnRH on the final maturation oocyte and the spawning of cachama negra (*Colossoma macropomum*). Revista Científica, FCV-LUZ, XIX: 486-494, 2009.

Agostinho AA, Júlio Júnior HF, Gomes LC, Bini LM, Agostinho CS. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna *In*: Vazzoler AEAM, Agostinho AA, Hahn NS (Ed.). A Planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá: EDUEM, 1997. cap.II.4, p.179-208.

Albrecht MP, Caramaschi EP. Feeding Ecology of *Leporinus friderici* (Teleostei; Anostomidae) in the Upper Tocantins River, Central Brazil, before and after Installation of a Hydroelectric Plant. Stud Neotrop Fauna Environ. 38(1):33-40, 2003.

Andrade DR, Vidal Jr MV. Novas observações sobre a desova induzida do piau-vermelho (*Leporinus copelandii*), STEINDACHNER, 1875). *In*: Encontro da Associação Mineira de Aquicultura, 9, Belo Horizonte, Anais, p.31. 1991.

Andrade DR, Souza GAP, Júnior MVV *et al.* Morfometria como instrumento da estimação da fecundidade de fêmeas de piau-vermelho (*Leporinus copelandii*), na bacia do Baixo Rio Paraíba do Sul. Revista ceres, Viçosa, MG. 52(302):467-479, 2005.

Billard R, Reinaud P, Hollebecq MG, Breton B. Advancement and synchronization of spawning in Salmo gairdneri and S. trutta following administration of LRH-A combined or not with pimozide. Aquaculture, 45: 57-66. 1984

Bizzotto PM. Trânsito de peixes na escada da UHE-Igarapava, Rio Grande, Alto Paraná. Dissertação de Mestrado em Zoologia de Vertebrados, PUC Minas, Belo Horizonte, p. 52, 2006

Bonnet E, Fostier A, Bobe, J. Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. BMC Genom. 8:55, 2007.

Brown CL, Bern HA. Hormones in early development, with special reference to teleost fish. In: Scanes CG, Scheibman MP. (Eds), Academic Press, San Diego. 189-306, 1989.

Carneiro PCF, Mikos JD. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. Acta Sci. Anim. Sci. 30(3):345-350, 2008.

Carneiro PCF, Kaiseler PHS, Swarofsky EAC, Baldisserotto B. Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. Neotropical Ichthyology. 7(2): 283-288, 2009.

Cejko BI, Targońska K, Kowalski RK, Żarski D, Sarosiek B, Kucharczyk D, Glogowski J. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace

Leuciscus leuciscus (L.). Journal of Applied Ichthyology. 28: 873-877, 2012.

Crim LW, Glebe BD. Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LHRH analog. Aquaculture. 43: 47-56, 1984.

Criscuolo-Urbinati ER, Kuradomi Y, Urbinati EC, Batlouni SR. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Theriogenology. 78: 2087-2094, 2012.

Durães R, Pompeu PS, Godinho AL. Alimentação de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, anostomidae) durante a formação de um reservatório no sudeste do brasil. Iheringia. 90:183-191, 2001.

Donaldson EM, Hunter GM. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. Fish physiology. New York: Academic Press, v.9, p.351-403, 1983.

Feist G, Schreck CB, Fitzpatrick MS, Redding JM. Sex steroid profiles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during early development and sexual differentiation. Gen Comp Endocrinol. 80(2):299-313, 1990.

Garavello JC. Revisão taxonômica do gênero *Leporinus* SPIX, 1829 (Ostariophysi, Anostomidae). Tese (USP), São Paulo, Brasil, 1979.

Gillet C, Breton B, Mikolajczyk T. Effects of GnRHa and pimozide treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10°C. Aquatic Living Resources 9, 257-263, 1996.

Godoy MP. Peixes do Brasil. Piracicaba: Ed. Franciscana, 1975.

Goren A, Zohar Y, Fridkin M, Elhanati E, Koch Y. Degradation of gonadotropin releasing hormone in the gilthead seabream, *Sparus aurata* : I. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary. Gen. Comp. Endocrinol. 79:291-305, 1990.

Habibi HR, Peter RE, Nahorniak CS, Milton RC de L, Millar RP. Activity of vertebrate gonadotropin-releasing hormones and analogs with variant amino acid residues in positions 5, 7 and 8 in the goldfish pituitary. Regulatory Peptides. 37:271-284, 1992.

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

Haraldsson H, Sveinsson T, Skúlason S. Effects of LHRHa treatments upon the timing of ovulation and upon egg and offspring quality in Arctic char, *Salvelinus alpinus (L.)*. Aquaculture & Fisheries Management. 24:145-150, 1993.

Harvey BJ, Hoar WS. The theory and pratice of induce breeding in fish. International Development Research Center - IDRC, (TS21e), 1979.

Harvey B, Carolsfeld J. Induced breeding in tropical fish culture. IDRC, x +144 p.: ill, Otawa, 1993.

Heyrati FP, Mostafavi H, Toloee H, Dorafshan S. Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) using (D-Ala6, Pro9-NEt) GnRH a

combined with domperidone. Aquaculture, 265:288-293, 2007.

Horvath L, Szabo T, Burke J. Hatchery testing of LH-RH analogue containing pellets on ovulation in four cyprinid species. Pol Arch Hydrobiol, 44:221–226, 1997.

Hwang PP, Wu SM, Lin JH, Wu LS. Cortisol content of eggs and larvae of teleosts. Gen. Comp. Endocrinol. 86:189-196, 1992.

Kayim M, Bozkurt Y, Ogretmen F. Comparing the effectiveness of Ovopel and carp pituitary extract (CPE) on artificial spawning of scaly carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal and Veterinary Advances. 20(9):2589-2592, 2010.

Lethimonier C, Madigou T, Muñoz-Cueto JA, Lareyre JJ, Kah O. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptor in teleost fish. General and Comparative Endocrinology. 135:1-16, 2004.

Levavi-Zermonsky B, Yaron Z. Changes in Gonadotropin and Ovarian Steroids Associated with Oocytes Maturation during Spawning Induction in the Carp. General and comparative endocrinology. 62:89-98, 1986.

Levavi-Zermonsky B, Yaron Z. Changes in Gonadotropin and Ovarian Steroids Associated with Oocytes Maturation during Spawning Induction in the Carp. General and comparative endocrinology. 62:89-98, 1986.

Lopes JP, Leal ALG. Desova induzida em Piau-de-vara *Schizodon fasciatus* spix & agassiz, 1829 para propagação artificial. Rev. Bras. Eng. Pesca. 5(1): XIV-XX, 2010

Lovejoy DA, Corrigan AZ, Nahorniak CS, Perrin MH, Porter J, Kaiser R, Miller C, Pantoja D, Craig AG, Peter RE, Vale WW, Rivier JE, Sherwood NM. Structural modifications of non-mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) isoforms: design of novel GnRH analogues. Regul. Peptides. 60:99-115, 1995.

Mikolajczyk T, Kuzminski H, Dobosz S, Goryczko K, Enright WJ. The effects of Gonazon TM, a commercially available GnRH analogue, on induction of ovulation and egg duality in cultured European white-fish (*Coregonus laveratus L.*). Advances in Limnology. 60:187-194, 2005.

Murthy CK, Turner RJ, Nestor JJ, jun Rivier JE, Peter RE. A new gonadotropin-releasing hormone (GnRH) superagonist in goldfish: influence of dialkyl-D-homoarginine at position 6 on gonadotropin-II and growth hormone release. Regul. Peptides. 53:1-15, 1994.

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

Mylonas CC, Sullivan CV, Hinshaw JM. Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. Fish Physiology and Biochemistry 13:485-493, 1994.

Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen Comp Endocrinol. 165:516-534, 2010.

Mylonas C, Mitrizakis N, Castaldo C, Cerviño C, Papadaki M, Sigelaki, I. Reproduction of hatchery-produced meagre Argyrosomus regius in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg prodcution and egg quality, Aquaculture. 414-415, 2013.

Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish. Dev. growth differ. 50:195-219, 2008.

Nomura H. Biologia da piava, *Leporinus copelandii* Steindachner, 1875 do Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo. Tese de Doutoramento, III + 79 pp., UNICAMP, Campinas, 1970.

Noori A, Amiri BM, Mirvaghefi A, Baker DW. LHRHa-induced ovulation of the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) and its effect on egg quality and two sex steroids: testosterone and 17α-hydroxyprogesterone. Aquaculture Research. 41: 871-877, 2010.

Olito C, Loopstra D, Hansen P. Acceleration of sexual maturation in chinook salmon broodstock using luteinizing hormone-releasing hormone analog. North American Journal of Aquaculture. 63:208-214, 2001.

Paulino MS, Sampaio M, Miliorini AB, Murgas LDS, Lima FSM, Felizardo VO. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de buserelina. Boletim do Instituto de Pesca. 37:39-45, 2011.

Pankhurst NW, Tomas PM. Maintenance at elevated tempertaure delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout Oncorhynchus mykiss to luteinizing hormone releasing hormone analogue. Aquaculture. 166:166 –177, 1998.

Park, W.D., Lee, Ch.H., Lee, Ch.S., Kim, D-J., Kim, J-H., Tamaru, C.S., Sohn, YCh., 2007. Efects of gonadotropin-releasing hormone analog combined with pimozide on plasma sex steroid hormones, ovulation and egg duality in freshwater-exposed female chum salmon (Oncorhynchus keta). Aquaculture 271, 488 –497.

Peter RE, Chang JP, Nahorniak CS, Omeljaniuk RJ, Sokolowska M, Shih SH, Billard R. Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. Recent Progress in Hormone Research. 13:229-239, 1986.

Peter RE, Lin HR, Van Der Kraak G. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and Dopamine antagonists. Aquaculture, 74:1-10, 1988.

Peter RE, Lin HR, Van Der Kraak G, Little M. 1993. Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. J.F. Muir and R.J. Roberts (Eds.), Recent Advances in Aquaculture, Vol. IV, Blackwell, Oxford, 25-30.

Peter RE, Marchant TA. The endocrinology of growth in carp and related species.Aquaculture. 129:299-321, 1995.

Peter RE, Yu KL. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basics applied aspects. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 7:173-197, 1997.

Rahman MA, Ohta K, Chuda H, Nakano S, Maruyama K, Matsuyama M. Gonadotropin-induced steroidogenic shift towards maturation-inducing

hormone in Japanese yellowtail during final oocyte maturation. Journal of Fish Biology. 58(2):462-474, 2001.

Reynalte-Tataje D, Zaniboni-Filho E, Muelbert B. Stages of the embryonic development of the piavuçu *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988). Acta Scientiarum. 23(4):823-827, 2001.

Reynalte-Tataje DA, Lopes CA, Ávila-Simas S, Garcia JRE, Zaniboni-Filho E. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning? Natural Science. 5(7A):1-6, 2013.

Rezende APS, Alves CBM, Silva MOB, Mello CBM. Avaliação da maturação gonadal e indução da reprodução de peixes coletados no Rio Grande, a jusante da UHE Itutinga, MG. Arq. bras. med. vet. Zootec. 48(1):39-46, 1996.

Sampaio EV, Sato Y. Aspectos reprodutivos de *Leporinus piau* Fowler, 1941 (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio São Francisco, submetido à desova induzida. Ciência Animal Brasileira,10(1):157-165, 2009.

Sato Y, Fenerich-Verani N, Verani J R, Vieira LJS, Godinho HP. Induced reproductive responses of the neotropical anostomid fish Leporinus elongatus Val. under captive breeding. Aquaculture Research. 31(2):189-193, 2000.

Schreck CB, Fitzpatrick MS, Feist GW, Yeoh CG. Steroids: developmental continuum between mother and offspring. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS. Eds. Proceedings of the 4thInternational Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, FishSymp 91, Sheffield, 256-258, 1991.

Sharaf SM. Effect of GnRHa, pimozide and Ovaprim on ovulation and plasma sex steroid hormones in African catfish *Clarias gariepinus,* Theriogenology. 77: 1709-1716, 2012.

Szmyt M, Dobosz S, Kucharczyk D, Grudniewska J, Lejk AM. Impact of selected hormonal agents on the effectiveness of controlled reproduction of cultivated female European grayling. Arch. Pol. Fish. 20:289-297, 2012.

Streit Jr, DP, Moraes GV, Ribeiro RP, Sakaguti ES, Povh JA, Moreira HLM. Effects of three different sources of pituitary extract on gonadal inducer in male and female pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Acta Scientiarum (UEM), Maringá, 27(4):439-447, 2005.

Suplicy FM (2007) Freshwater fish seed resources in Brazil. In: Bondad-Reantaso MG, editor. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, No. 501, FAO, Rome. pp. 129–143.

Taranger GL, Stefansson SO, Hansen T. Advancement and synchronization of ovulation in Atlantic salmon (*Salmo salar L*.) following injections of LHRH analogue.Aquaculture. 102:169-175, 1992.

Targońska K, Kucharczyk D, Kujawa R, Mamcarz A, Zarski D. Controlled reproduction of asp, *Aspius aspius* (L.) using luteinizing hormone

releasing hor-mone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. Aquaculture. 306:407–410, 2010.

Targońska K, Kucharczyk D. The Application of hCG, CPH and Ovopel in Successful Artificial Reproduction of Goldfish (*Carassius auratus auratus*) Under Controlled Conditions. Reprod Dom Anim. 46:651-655, 2011.

Trudeau VL, Peter RE. Functional interactions between neuroendocrine systems regulating GtH-II release. *In* Goetz FW, Thomas, P. eds. Reproductive Physiology of Fish, 1995. Austin, TX: Fish Symposium. 95:44–48, 1995.

Vaz MM, Torquato VC, Barbosa ND DEC. Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande. Belo Horizonte, CEMIG e CETEC, 144p, 2000.

Von Ihering R, Azevedo P. A desova e a hipofisação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. Arch. Inst. Biol. 7:107-18, 1936.

Wang Y, Hu M, Wang W, Liu X, Cheung SG, Shin PKS, Song L. Effects of GnRHa (D-Ala^{6},Pro^{9}-NEt) combined with domperidone on ovulation induction in wild loach *Misgurnus anguillicaudatus.* Aquaculture. 291:136-139, 2009.

Woynarovich E, Horváth L. A propagação artificial de peixes de águastropicais: manual de extensão. Brasília, FAO/ CODEVASF/CNPQ, 225p, 1983.

Yaron Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. Aquaculture.129, 49-73, 1995.

Zaniboni-Filho E, Weingartner M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. Rev. bras. reprod. anim. Belo Horizonte. 31:367-373, 2007.

Zohar Y, Mylonas CC. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture. 197: 99-136, 2001.

MANUSCRITO II

Efeito de duas temperaturas (25 e 29ºC) na diferenciação gonadal de piau-três-pintas, *Leporinus friderici*.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o início da diferenciação gonadal de *L. friderici* expostos a 25 e 29ºC, por 190 dias em sistema de recirculação de água, e avaliar a influência dessas temperaturas sobre o processo de diferenciação gonadal e proporção sexual. Para isso, foram amostrados aleatoriamente cinco peixes, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210 e 240 dias após eclosão (DAE), de cada tratamento. A diferenciação gonadal se iniciou com o sexo feminino, aos 150 DAE (11,4cm e 16,4g) a 25ºC e aos 170 DAE (10,7 ± 0,7cm e 27,7 ± 8,5g) aos 29ºC. A diferenciação em testículo teve inicio aos 190 DAE a 29ºC (38,0g e 14,5cm), no entanto, ao longo do período experimental não foi observada diferenciação em testículo a 25ºC. De um total de 50 animais amostrados por tratamento, ao longo de todo o período experimental, o número de animais diferenciados foi de 17 (12 fêmeas e 5 machos) e 3 (3 fêmeas) a 29ºC e 25ºC, respectivamente. Após a diferenciação (190-240 DAE), as médias de peso corporal (P) e comprimento padrão (CP) foram predominantemente superiores a 29ºC (*P>0,05*). O desenvolvimento gonadal de *L. friderici* se mostrou semelhante ao das espécies gonocorísticas "diferenciadas". Concluímos que a temperatura mais elevada (29ºC) influenciou no aumento de P e CP, intensificou a diferenciação gonadal e foi mais eficiente na obtenção de um maior número de fêmeas. Desta maneira, a produção de fêmeas, que é o gênero de maior interesse econômico, possivelmente pode ser obtida em maior proporção com a incubação à temperatura de 29ºC, próximo aos 190 DAE, uma vez que a espécie apresentou 100% de sobrevivência e melhores médias de CP e P, nessas condições.

Palavras chave: determinação sexual, gônadas, fêmeas, peixe, temperatura.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the onset of gonadal differentiation *L. friderici* reared at 25 and 29ºC for 190 days in water recirculation system, and evaluate the influence of these temperatures on the process of gonadal differentiation and sex ratio. For this, five fish were randomly sampled at 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210 and 240 days after hatching (DAE) of each treatment. The gonadal differentiation started within females, at 150 DAE (11.4cm and 16.4g) at 25°C and 170 DAE (10.7 ± 0.7 cm and 27.7 ± 8.5 g) to 29ºC. Testicle differentiation started at 190 DAE at 29°C (38.0g and 14.5cm), however, although no testicular differentiation was observed at 25°C. From a total of 50 fishes sampled in each treatment, the number of different animals was 17 (12 females and 5 males) and 3 (3 females) at 29°C and 25°C respectively. After differentiation (190-240 DAE), the average weight (P) and standard length (CP) were predominantly higher than 29ºC (*P>0.05*). The gonadal development *L. friderici* was similar to that of gonochoristic species "differentiated". We concluded that higher temperature (29°C) increased P and CP, intensified gonadal differentiation and was more efficient in obtaining an increased number of females. Thus, the production of females, in which better economic interest, may be obtained in larger proportions after the incubation at 29°C, close to the 190 DAE, since the species showed 100% survival and better medium CP and P, in these conditions.

Key words: sex determination, gonads, females, fish, temperature.

1. INTRODUÇÃO

O *L. friderici* é uma espécie reofílica (Nomura, 1970; Godoy, 1975) que apresenta fecundação externa, com período reprodutivo de novembro a fevereiro (Garavello, 1979). A espécie apresenta qualidade de carne elevada e aceitação para pesca esportiva (Andrade e Vidal, 1991). No entanto, o *L. friderici* está presente em rios que sofrem represamento (Agostinho *et al*., 1997; Durães *et al*., 2001; Albrecht *et al*., 2003; Bizzotto, 2006), prejudicando sua reprodução e consequentemente os estoques naturais. Observações a campo mostram que esta é uma espécie presente tanto em rios que sofrem represamento quanto em ambientes degradados, figurando entre as espécies mais importantes para a pesca local (Agostinho *et al.,* 1997; Durães *et al*., 2001; Albrecht *et al*., 2003; Bizzotto, 2006). Desta forma, em grande parte do território nacional, existe a procura de alevinos de *L. friderici* para aquicultura e programas de repovoamento (Suplicy, 2007), no entanto, de acordo com os últimos registros datados do ano de 2005, o Brasil produz pouco mais de 5 milhões de alevinos de *L. friderici* tentando suprir todos os nichos de mercado (Suplicy, 2007).

Desta maneira, uma alternativa para potencializar a produtividade da espécie é a formação de populações monosexo, amplamente utilizada em sistemas de produção de peixes, pois direciona a diferenciação para o gênero que proporciona alguma vantagem zootécnica, normalmente para aquele que apresente as melhores taxas de crescimento (Devlin e Nagahama, 2002). Desta forma, o controle dos processos que determinam o sexo pode alavancar a produtividade para o gênero que apresenta as características morfológicas de interesse econômico (Devlin e Nagahama, 2002). Em peixes, a expressão do

sexo depende de dois eventos: da determinação sexual, que são os processos e variáveis que influenciam a diferenciação sexual, podendo ser genéticos ou ambientais; e da diferenciação sexual, que indica a realização física destes eventos, em termos de desenvolvimento dos ovários ou testículos (revisão em Shen e Wang, 2014). Sabe-se que a determinação do sexo em peixes é um processo muito flexível e sujeita a alteração por fatores externos (Devlin e Nagahama, 2002).

Os fatores ambientais têm forte influência sobre o processo de diferenciação sexual, sendo a temperatura da água um desses fatores (Baroiller *et al*., 1999). Na maioria das espécies de peixes termossensíveis, a proporção do sexo masculino aumenta com a elevação da temperatura da água, por outro lado, temperaturas mais baixas induzem o desenvolvimento dos ovários (revisto por Baroiller *et al*., 1999). A temperatura interfere na esteroidogênese das gônadas, principalmente através da modulação da expressão do gene *cyp19a1a* (Strüssmann e Nakamura, 2002). Este gene codifica um polipeptídio e expressa uma proteína, a enzima aromatase, enzima chave na conversão de andrógenos em estrógenos (Simpson *et al*.,1994).

Nos peixes, em geral, os hormônios esteroides desempenham um papel crucial na regulação do processo de diferenciação sexual (Baroiller e Guiguen 2001). Em peixes, os esteroides sexuais são sintetizados principalmente por células somáticas das gônadas, ou seja, células foliculares e da teca nos ovários, e, células de Leydig nos testículos (Fostier *et al.*, 1983; Guraya, 2001). A testosterona (T) não está diretamente envolvida nos mecanismos de diferenciação sexual, mas participa como precursor do 17β-estradiol (E2) (Nakamura *et al*., 1998; Baroiller *et al.,* 1999). O andrógeno 11-

Ketotestosterone (11-KT) é o principal responsável na regulação do desenvolvimento testicular. O E2 induz e mantem o desenvolvimento ovariano (Devlin e Nagahama, 2002). De acordo com Bogart (1987) e Baroiller *et al*. (1999), o excesso de 11-KT induz a diferenciação masculina, enquanto o excesso de E2 induz a diferenciação feminina. Essa constatação tem sido observada em várias espécies de teleósteos (Rougeot *et al*., 2007).

Outro mecanismo responsável pela determinação sexual é o genético. Os genes que determinam o sexo podem se apresentar espalhados por todo o genoma (cromossomos autossomos, presentes em sistema monogênico) ou em sua maioria concentrada em um par de cromossomos (cromossomos sexuais, presentes em sistema poligênico) (Piferrer, 2001; Devlin e Nagahama, 2002). Estudiosos sugerem que o *dmy* seja o principal gene determinante do sexo masculino, equivalente ao gene *sry* de mamíferos (Sheng e Wang, 2014). Os autores anteriormente mencionados sugerem também que, durante o período de determinação do sexo, o nível de expressão do gene *dmy* é crítico para a sua função, uma vez que os mutantes que não expressam este gene não se diferenciam em machos, e se desenvolvem como fêmeas invertidas (XY) (Sheng e Wang, 2014).

Em suma, a demanda de informações para criação de *L. friderici* é crescente, principalmente por figurar entre as espécies mais recorrentes na pesca comercial e de subsistência (Vaz *et al*., 2000). Nesta espécie, sabidamente as fêmeas apresentam taxas de crescimento superiores à dos machos (Rêgo, 2008; Lopes *et al*., 2000), fator este que pode ser empregado na produção de populações monosexo em ambiente controlado. Segundo os dados do Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAEE, 1984), as

variações de temperaturas apresentadas nas águas do rio Sapucaí mirim - Grande estão na faixa de 22 a 29ºC. Assim, uma vez que a produção de populações monosexo feminino pode ajudar a aumentar a produtividade da espécie, tivemos como objetivo neste estudo determinar o início da diferenciação gonadal de *L. friderici* expostos a 25 e 29ºC (dos 50 até os 240 dias após eclosão), dentro da faixa de temperatura encontrada em ambiente natural, e avaliar a influência dessas temperaturas nas taxas de comprimento padrão (CP), peso corporal (P), sobrevivência e proporção sexual.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem dos animais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução de Peixes no Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP - da Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal, durante o período de fevereiro a agosto de 2014. Alevinos de 50 dias após a eclosão (DAE) foram obtidos da reprodução induzida, no periodo de dezembro de 2013, de matrizes selvagens capturadas no rio Sapucaí Mirim, previamente domesticadas. Para a obtenção desses alevinos, matrizes e reprodutores selvagens foram capturados no rio Sapucaí Mirim e transferidos ao CAUNESP para domesticação por um periodo de 2 anos. Essas matrizes e reprodutores fazem parte de um projeto de repovoamento de peixes do rio Sapucaí Mirim, impactadas por barreiras físicas (construção de barragens) visando à produção de energia elétrica. Dessa forma, a soltura de alevinos provenientes de cruzamentos dirigidos, viabilizado pela marcação e análise genética de cada reprodutor e matriz, possibilita a preservação da variabilidade genética dos peixes coletados na natureza.

2.2 Larvicultura

Após a obtenção da desova em sistema semi-natural, aproximadamente 2000 ovos (*pool* de oito fêmeas) foram transferidos para cada incubadora cônica tipo funil de 120L (n = 6). Após a eclosão, as larvas foram mantidas por um periodo de 15 dias nas incubadoras, alimentadas quatro vezes ao dia (08:00; 11:00; 14:00 e 17:00 horas), como segue: 1º ao 4º dias: 50 náuplios de *Artemia* / larva / dia (BioArtemia. Ltda, RN, Brasil.); 5º ao 8º dias: 100 náuplios / larva / dia; 9º ao 10º dias: 150 náuplios / larva / dia; 10º ao 15º dias: 300 náuplios / larva / dia. A dieta, do 1º ao 15º dia, foi suplementada com ração

comercial em pó (40,0% PB) até a saciedade e com “solução de ovos de galinha” duas vezes ao dia. A “solução de ovos de galinha” elaborada para aproximadamente 200 mil larvas, constitui-se de um ovo inteiro, batido em água em ponto de ebulição seguido de choque termico com água fria (de acordo com protoclo proposto por Amaral Júnior, 2007). Esse tipo de alimento foi fornecido em função do tamanho reduzido da boca do *L. friderici*. Larvas mortas e restos de alimento foram removidos diariamente.

No 16º dia após a eclosão (DAE), as larvas foram transferidas para viveiros escavados (~200m^3) do CAUNESP onde foram mantidas até o 50º DAE. Os viveiros foram adubados e manejados para larvicultura de espécies nativas (Graeff *et al.*, 2008). As larvas foram arraçoadas até a saciedade, sete dias na semana, em duas porções ao longo do dia (9:30 e 16:30 horas), com ração comercial farelada para peixes onívoros (composição: 10,0% de teor de umidade; 55,0% de proteína bruta, 7,0% de extrato etéreo, 2,8% de fibra, 4,2% de Cálcio, 1,5% de fósforo).

2.3 Delineamento experimental

Cento e dez peixes de 50DAE (comprimento padrão médio = 6,7 ± 0,1 cm e peso total médio = 6,1 ± 0,3 g) foram distribuidos igualmente e aleatoriamente em 10 caixas (11 peixes por caixa / 5 caixas por tratamento) resultando em uma densidade de ~0,75 g / L. Os tratamentos (um a temperatura de 25 ºC e o outro a 29 ºC) foram constituídos por dois sistemas independentes de recirculação de água, compostos por filtros biológicos e bombas de calor com controladores digitais. As bombas de calor permitiram manter a temperatura constante através de um painel digital o qual era monitorado diariamente. Como unidades experimentais foram utilizadas caixas

pretas de polipropileno, com formato retangular, preenchidas com 90L de água. Cada caixa com capacidade para ~140L possuia dimensões internas de 71,0 x 51,0 x 39,0 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente).

Durante o período experimental, os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada (composição: 10% de teor de umidade; 38% de proteína bruta; 7,5% de extrato etéreo; 5% de fibra; 3% de Cálcio; 1,45% de fósforo) fornecida até a saciedade, quatro vezes ao dia. Uma vez ao dia foi realizado a sifonagem dos restos de ração e fezes e quatro vezes ao dia (9:00; 12:00, 15:00 e 18:00 horas) o sistema de retrolavagem dos filtros biológicos foram acionados para limpeza. O fluxo de água e a oxigenação foram controlados por meio de torneiras e pedras porosas em todas as caixas. Os peixes foram mantidos em condições de fotoperíodo natural no CAUNESP (21º15'17" S e 48º19'20" W).

2.4 Parâmetros de qualidade da água

Os parâmetros da qualidade da água foram aferidos para as cinco caixas de cada tratamento. Para isso, o oxímetro HI9146-10 (Hanna Instruments – Resolução: 0,01mg/L) foi utilizado para mensuração do oxigênio dissolvido (diariamente); o medidor de pH HI98172 (Hanna Instrument - Acurácia: ± 0,1 pH) para pH (semanalmente); e um condutivímetro HI98311 (Hanna Instruments – acurácia de 0,1µS/cm para condutividade e de 0,15ºC para temperatura) para mensuração da condutividade (semanalmente) e temperatura (duas vezes ao dia).

2.5 Biometrias e preparos histológicos

Para determinar o início da diferenciação gonadal e avaliar se existe influência da temperatura na diferenciação foram amostrados aleatoriamente cinco peixes, de cada tratamento, nos períodos de 50, 70, 90, 110, 130, 150,

170, 190, 210 e 240 dias após eclosão (DAE). Biometrias foram realizadas determinando o peso total individual (g) e comprimento padrão (cm). Após a biometria, os peixes foram eutanasiados com uma dose letal de benzocaína (etil-aminobenzoato), na proporção de 0,05g (diluída em 7,5mL de álcool 96,0ºGL) para 1L de água. As gônadas foram retiradas e fixadas em solução de Karnovsky. Em seguida, foram lavadas em álcool etílico 70% e submetidas às técnicas de rotina de inclusão em glicol metacrilato (Leica historesin embedding kit, Leica Microsystems, Nussloch, DE). Posteriormente, foram realizados cortes de 3 µm de espessura em micrótomo rotativo Leica RM2245 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça). Os cortes foram alocados em lâmina, corados com Hematoxilina e Eosina (HE), montados com lamínulas e cobertos com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Após esse processo, as secções histologicas foram observadas sob um microscópico binocular Leica DM4000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), equipado com uma câmera Leica DFC310 FX. As capturas de imagens foram realizadas com o auxilio do software Leica LAS v4.3.0 (Leica Microsystems).

2.6 Diferenciação sexual

A diferenciação sexual foi avaliada para cada indivíduo, por um único observador, sem a informação dos tratamentos. Para a caracterização do sexo foram adotados os seguintes critérios: nos machos, presença de cistos de espermatogônias e espermatócitos, e nas fêmeas, presença de ovócitos em crescimento primário. Os efeitos das temperaturas da água na diferenciação foram estimados considerando as proporções sexuais nos dois tratamentos.

2.7 Certificação do trabalho

Esse trabalho foi certificado, e documentado com número de protocolo

019375/13, por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal. A certificação foi adotada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" de Jaboticabal, SP.

2.8 Análise dos resultados

A análise estatística foi realizada utilizando o programa de computador STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Os pressupostos como a normalidade e homoscedasticidade foram testados. Para as variáveis comprimento padrão e peso corporal as diferenças estatísticas foram determinadas através da análise de variância (ANOVA *one way*) seguido do teste de *Tukey HSD*. Os testes foram realizados com o nível de significância de $\alpha=0,05$, com os dados expressos por média seguida do erro padrão (média ± EP).

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros de qualidade da água.

Os valores médios dos parâmetros de qualidade da água foram: tratamento a 25ºC: 25,0 ± 0,2ºC de temperatura; 7,3 ± 0,2 de pH; 7,8 ± 0,2mg/L de oxigênio dissolvido; 101,7 ± 4,6µS.cm de condutividade da água. Tratamento a 29ºC: 29,0 ± 0,2ºC de temperatura; 7,7 ± 0,2 de pH; 7,3 ± 0,2mg/L de oxigênio dissolvido; 108,3 ± 4,3µS.cm de condutividade da água.

3.2 Dados biométricos

Durante o período experimental não foram constatadas mortalidades em ambos os tratamentos. Os valores médios iniciais (aos 50 DAE) foram de 6,0 ± 0,4g e 6,6 ± 0,2cm, nos peixes mantidos a 25ºC, e 6,2 ± 0,5g e 6,7 ± 0,2cm, nos mantidos a 29ºC (Figura 1A-B e 2). Os perfis da distribuição de P e CP em ambos os tratamentos foram similares até os 170 DAE (Figura 1). Aos 190 DAE observamos médias superiores de P e CP em peixes mantidos a 29ºC em relação aos peixes mantidos a 25ºC, com valores médios de P de 47,5 ± 8,0g e 21,8 ± 2,3g; e valores médios de CP de 13,1 ± 0,4cm e 10,2 ± 0,4cm, nos tratamentos de 29 e 25ºC, respectivamente ($P < 0,05$). Posteriormente aos 190 DAE, os valores médios de P e CP do tratamento de 29^{o}C se mantiveram superiores aos do tratamento de 25^{o}C ($P < 0,05$) (Figura 1 e 2).

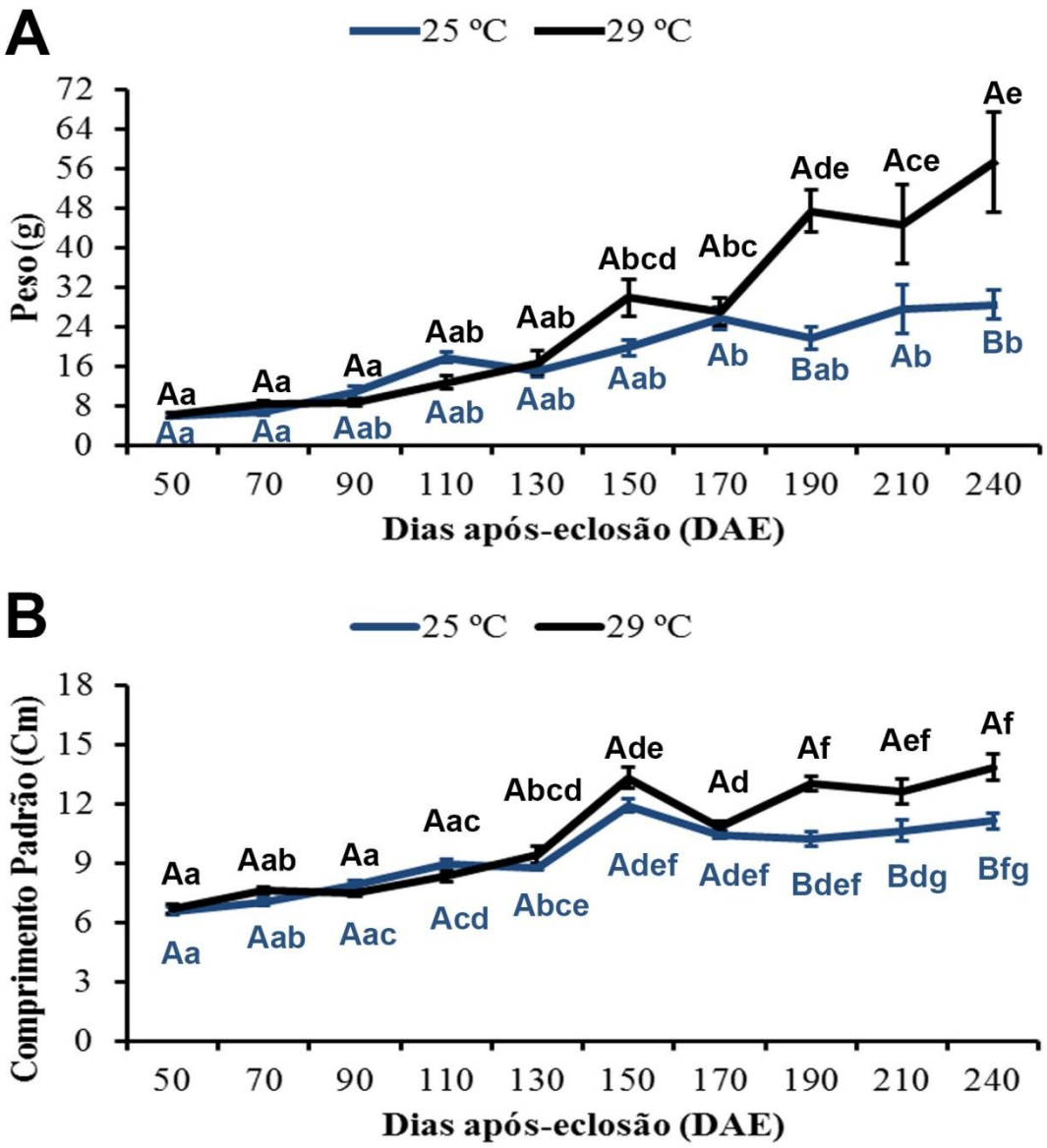

Figura 1. Valores médios de: A- peso (g); e B- comprimento padrão (cm) (± EP) dos *L. friderici* jovens mantidos em duas temperaturas de água (25ºC e 29ºC). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$) e minúsculas ao longo do período experimental no mesmo tratamento ($P < 0,05$).

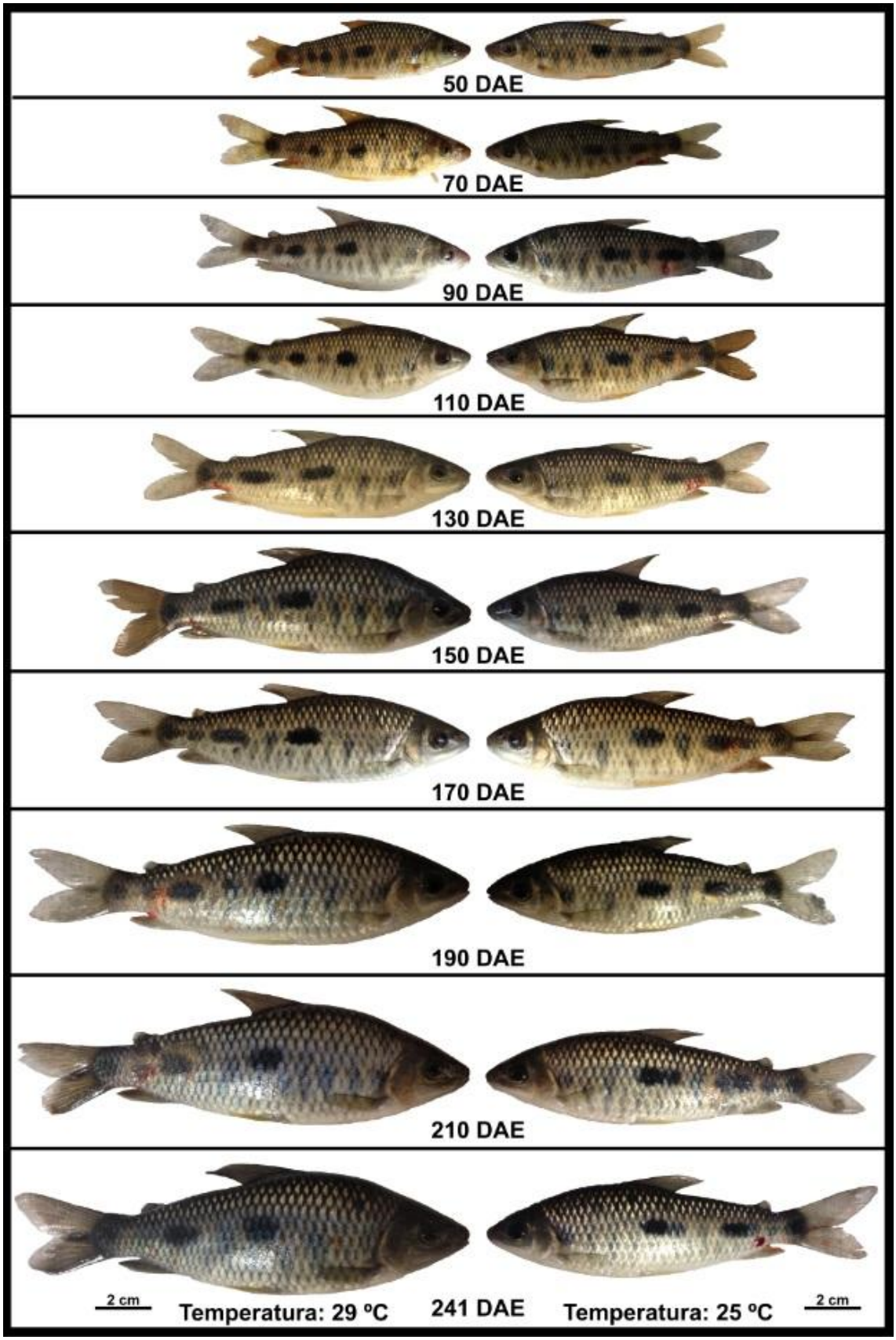

Figura 2. Representação das características externas de *L. friderici*, mantidos em caixas de água em temperaturas controladas a 29 e 25ºC, dos 50 aos 240 dias após eclosão (DAE).

3.3 Análise macro e microscópica das gônadas

3.3.1 Diferenciação gonadal

No *L. friderici* a diferenciação das gônadas foi diretamente de gônada indiferenciada para ovário ou testículo. As fêmeas de ambos os tratamentos não atingiram maturidade sexual durante o período experimental. No entanto, os machos mantidos a 29ºC, apesar de se diferenciarem mais tardiamente, já apresentavam em processo de espermiogênese. O padrão estrutural, descrito abaixo, foi encontrado para a diferenciação ovariana (a 25 e 29ºC) e testicular (apenas a 29ºC):

3.3.2 Diferenciação ovariana

Macroscopicamente, durante o período de diferenciação ovariana, os ovários de *L. friderici,* localizados longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática e paralelamente a bexiga natatória, apresentaram-se como órgãos pares, alongados, levemente achatados e translúcidos. As gônadas estavam aderidas à parede dorsal da cavidade pelo mesovário, uma membrana delgada de tecido conjuntivo. Com o desenvolvimento do ovário a região anterior ficou mais espessa se destacando da posterior. A tonalidade do tecido gonadal foi mudando de translucido para um tom levemente marrom-acinzentado e opaco. No final do período experimental foi possível observar vasos sanguíneos ao longo de todo o tecido gonadal.

3.3.3 Diferenciação testicular

Macroscopicamente, durante o período de diferenciação testicular, os testículos de *L. friderici,* localizados longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática e paralelamente a bexiga natatória, apresentaram-se como órgãos pares, alongados, levemente cilíndricos e translúcidos. As gônadas estavam aderidas à parede dorsal da cavidade pelo mesórquio, uma

membrana delgada de tecido conjuntivo. Com o desenvolvimento do testículo a região anterior ficou mais cilíndrica se destacando da posterior. A tonalidade do tecido gonadal foi mudando de translucido para um tom levemente marrom-acinzentado e opaco. No final do período experimental foi possível observar vasos sanguíneos ao longo de todo o tecido gonadal.

3.4 Evolução da diferenciação sexual

Dos 50 DAE aos 150 DAE foram observadas apenas células germinativas primordiais (PGCs) e células somáticas, ao longo do eixo longitudinal das gônadas indiferenciadas, em ambos os tratamentos (25 e 29ºC). Neste período, as PGCs permaneceram quiescentes e as gônadas continuaram indiferenciadas em ambos os tratamentos (Figura 3AB). Nesse período, foi visualizado apenas o espessamento do estroma das gônadas indiferenciadas e o aumentando em números das PGCs e das células somáticas. As PGCs apresentaram cromatina frouxa com ocorrência de nucléolos. A partir dos 150 DAE foram observados ovários, evidenciado por inúmeros ovócitos em crescimento primário (Figura 3CD). Por fim, a partir dos 190 DAE, apenas no tratamento a 29ºC, foram observados testículos, evidenciado por espermatogônias, espermatócitos e espermátides (Figura 3EF).

Os resultados das análises histológicas mostrando a proporção sexual ao longo do tempo estão representados na Tabela 1.

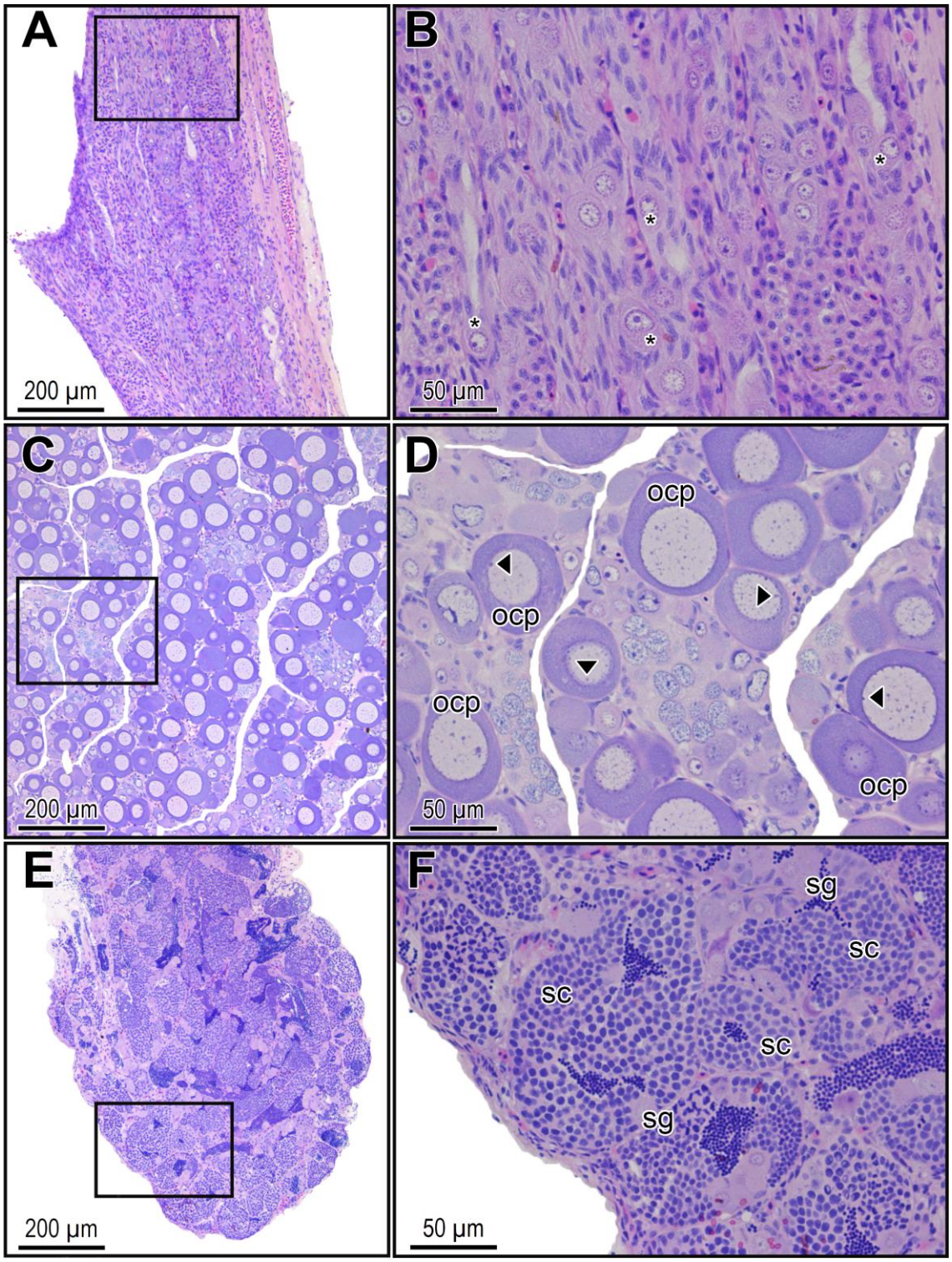

Figura 3. Fotomicrografia da secção longitudinal do tecido gonadal de *L. friderici.* A-B: gônada indiferenciada com 150 dias após a eclosão; C-D: ovário diferenciado em animal mantido a temperatura controlada de 29ºC; E-F: testículo diferenciado em animal mantido a temperatura controlada de 29ºC. Em destaque: quadrado – delimitação da região ampliada ao lado direito; asteriscos - célula germinativa primordial; cabeça de seta – "nucléolos"; ocp - ovócitos em crescimento primário; sg – espermatogônia; sc- espermatócitos. Coloração com HE.

Tabela 1. Relação do número de indivíduos por gênero (indiferenciado, fêmeas e machos), peso (g) e comprimento padrão (cm) dos animais coletados dos 50 aos 240 dias após-eclosão (DAE), em 25 e 29ºC.

DAE	Gênero	Temperatura 25ºC			Temperatura 29ºC		
		n	P (g)	CP (cm)	n	P (g)	CP (cm)
50	Indif	5	6,0 ± 0,4	6,6 ± 0,2	5	6,2 ± 0,5	6,7 ± 0,2
	Fêmeas	0	-	-	0	-	-
	Machos	0	-	-	0	-	-
70	Indif	5	6,7 ± 0,6	7,1 ± 0,2	5	8,5 ± 0,6	7,6 ± 0,1
	Fêmeas	0	-	-	0	-	-
	Machos	0	-	-	0	-	-
90	Indif	5	10,9 ± 1,2	7,9 ± 0,3	5	8,8 ± 0,6	7,5 ± 0,3
	Fêmeas	0	-	-	0	-	-
	Machos	0	-	-	0	-	-
110	Indif	5	17,8 ± 1,0	9,0 ± 0,2	5	12,7 ± 1,4	8,3 ± 0,3
	Fêmeas	0	-	-	0	-	-
	Machos	0	-	-	0	-	-
130	Indif	5	15,1 ± 1,2	8,8 ± 0,1	5	16,8 ± 2,3	9,4 ± 0,4
	Fêmeas	0	-	-	0	-	-
	Machos	0	-	-	0	-	-
150	Indif	4	20,6 ± 1,8	12,1 ± 0,4	5	29,9 ± 3,7	13,3 ± 0,5
	Fêmeas	1	16,4 ± 0,0	11,4 ± 0,0	0	-	-
	Machos	0	-	-	0	-	-
170	Indif	5	25,7 ± 2,3	10,5 ± 0,2	3	23,9 ± 0,7	10,7 ± 0,2
	Fêmeas	0	-	-	2	27,6 ± 8,5	10,7 ± 0,7
	Machos	0	-	-	0	-	-
190	Indif	5	21,8 ± 2,3	10,,2 ± 0,4	0		
	Fêmeas	0	-	-	4	49,8 ± 4,7	13,3 ± 0,3
	Machos	0	-	-	1	38,0 ± 0,0	12,1 ± 0,0
210	Indif	5	27,7 ± 5,0	10,7 ± 0,5	0		
	Fêmeas	0	-	-	3	42,5 ± 13,5	12,4 ± 1,0
	Machos	0	-	-	2	48,0 ± 8,6	13,1 ± 0,6
240	Indif	3	26,2 ± 1,3	11,0 ± 0,2	0		
	Fêmeas	2	31,8 ± 8,0	11,4 ± 1,2	3	63,1 ± 17,3	13,9 ± 1,2
	Machos	0	-	-	2	48,6 ± 1,6	13,9 ± 0,1
Média	**Indif**	**47**	**17,4 ± 1,3**	**9,3 ± 0,3**	**33**	**14,7 ± 1,6**	**9,0 ± 0,4**
	Fêmeas	**3**	**26,6 ± 6,9**	**11,4 ± 0,7**	**12**	**47,6 ± 6,1**	**12,8 ± 0,5**
	Machos	**0**	**-**	**-**	**5**	**46,3 ± 3,4**	**13,2 ± 0,4**

DAE - dias após-eclosão; n - numero amostral; P - peso; CP - comprimento padrão; Indif - indiferenciada; sombreado em cinza - início da diferenciação em fêmeas; sombreado em azul - início da diferenciação em machos.

O processo de diferenciação no tratamento a 25ºC foi mais precoce (150 DAE), porém menos intenso (apenas 3 animais) do que no tratamento a 29ºC (Figura 4 e Tabela 1).

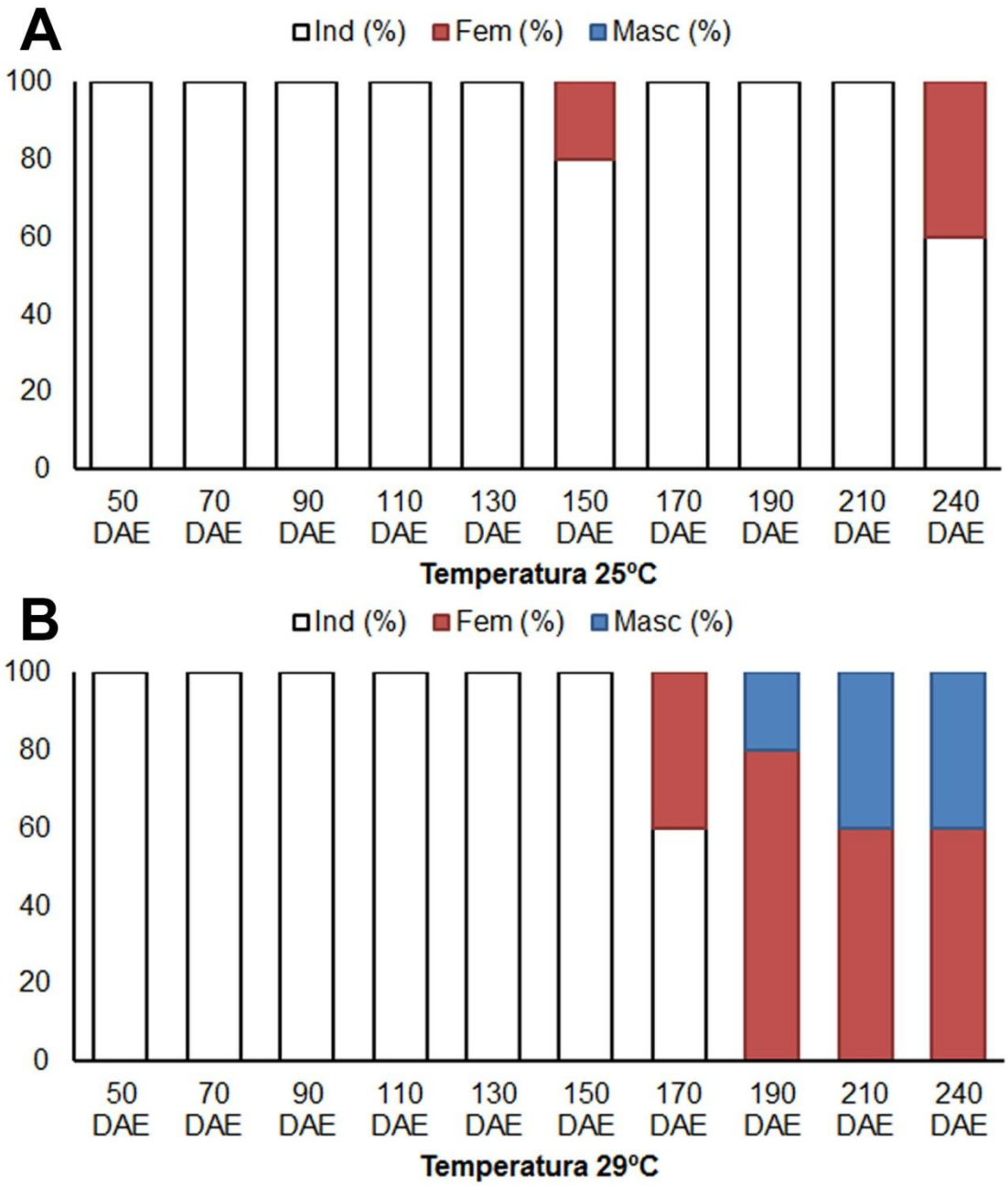

Figura 4. Evolução da diferenciação de *L. friderici*, mantidos em caixas de água em temperaturas controladas a 29 e 25ºC, dos 50 aos 240 dias após eclosão (DAE).

Devido ao pequeno número de animais diferenciados no tratamento a 25ºC não foi possível analisar estatisticamente a proporção sexual para comparação entre os tratamentos. Desta maneira, observamos ao longo de todo o período experimental a proporção de: 34% de fêmeas e 10% de machos, a 29ºC; e 6% de fêmeas e 0% de machos, a 25ºC.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, determinamos em *L. friderici* expostos a 25 e 29ºC o início da diferenciação gonadal e avaliamos a influência dessas temperaturas nas taxas de comprimento padrão (CP), peso corporal (P), sobrevivência e proporção sexual. Durante o periodo experimental a sobrevivência foi de 100%, em ambos os tratamentos. O inicio da diferenciação ocorreu aparentemente mais precocemente a 25ºC (150 DAE) do que em 29ºC (170 DAE), com a diferenciação de fêmeas em ambos os tratamentos. A diferenciação em machos foi encontrada somente a 29ºC (190 DAE). O número de animais diferenciados foi de 17 e 3 respectivamente a 29ºC e a 25ºC. Entre os animais diferenciados, 12 e 3 se diferenciaram em fêmeas respectivamente a 29 e 25ºC. A temperatura da água influenciou a média de P e CP, somente após a diferenciação a 29ºC (190-240 DAE), com excessão da média de P aos 210 DAE, a qual se manteve similar nos dois tratamentos ($P < 0,05$).

Observamos que o número de animais diferenciados foi maior a 29ºC comparado a 25ºC. Sabe-se que a temperatura mais alta (dentro do limite ótimo do animal) aumenta as taxas de crescimento e antecipa a maturação sexual em diversas espécies (Present e Conover, 1992; Billerbeck *et al*., 2000; Gotthard, 2001) e pode ser usada para este propósito no *L. friderici*, pois não causou mortalidade.

Sabe-se que a diferenciação sexual em peixes é regulada por hormônios esteroides sexuais (Baroiller *et al*., 1999) e indiretamente por enzimas esteroidogênicas (Baroiller *et al*., 1999), mas que fatores ambientais (Hunter e Donaldson, 1983) e manipulação hormonal (Van Winkoop *et al*., 1994) podem intensificar este processo. Dessa forma, podemos sugerir que a diferenciação

mais intensa em ovários observada neste estudo a 29ºC pode estar associada ao aumento plasmático dos níveis de andrógenos e estrógenos nesses peixes.

Neste contexto, a via mais convencional de desenvolvimento ovariano envolve a transcrição do gene *cyp19a1a* e a produção da proteina aromatase, a qual é responsavel pela sintese de estrógenos (Vernetti *et al.*, 2013), e que, dentre estes, o E2 induz e mantem o desenvolvimento ovariano (Devlin e Nagahama, 2002). Dessa forma é possível que a 29ºC a indução da transcrição da *cyp19a1a* tenha sido mais elevada do que a 25ºC.

Neste estudo, a diferenciação em sexo masculino (190-240 DAE) só foi observada a 29ºC. Strüssmann e Nakamura (2002) relatam que em peixes gonocorísticos diferenciados, o processo de diferenciação testicular é reconhecido claramente mais tarde do que nas fêmeas. Recentemente, foi demonstrado que em algumas espécies as altas temperaturas resultam em bloqueio da transcrição do *cyp19a1a* (Hayashi *et al*., 2010; Navarro-Martín *et al*., 2011), o que por sua vez pode levar ao desenvolvimento testicular de fêmeas genotípicas de teleósteos (Vernetti *et al.*, 2013). No entanto, observamos com o *L. friderici uma* elevada ocorrência de fêmeas a 29ºC, denotando que a temperatura utilizada provavelmente não influenciou no bloqueio da *cyp19a1a* a 29ºC. Ospina-Álvarez e Piferrer (2008) sugerem que somente as espécies com mecanismos de determinação sexual totalmente dependente da temperatura exibem relações de sexo masculino mais alto em resposta a aumentos da temperatura. Neste estudo, a temperatura mais alta (29ºC) acelerou a diferenciação dos peixes em fêmeas, mas não foi possível relacionar a proporção sexual. Desta forma, podemos sugerir que o *L. friderici* não seja uma espécie com mecanismos de determinação sexual totalmente

dependente da temperatura, no entanto, provavelmente a temperatura esteja influenciando nos mecanismos genéticos de determinação sexual desta espécie.

Observamos que a diferenciação gonadal em ovários caracterizou-se pelo reconhecimento de ovócitos em início da meiose, como é típico em teleósteos gonocorísticos (Nakamura *et al*., 1998; Strüssmann e Nakamura 2002). Apesar de ter diferenciação mais tardia, o desenvolvimento dos testículos foi relativamente mais rápido, visto que no final do período experimental já se encontrava testículos com processo avançado de espermiogênese, enquanto que os ovários permaneceram quiescentes com ovócitos em crescimento primário. Como observado em ambos os tratamentos, a diferenciação sexual da espécie parecer ser do tipo gonocorístico "diferenciado". No *L. friderici* o desenvolvimento da gônada indiferenciada originou diretamente fêmeas ou machos, não sendo observado nenhum indivíduo com características masculinas e femininas em um único peixe (intersexo). Esse tipo de desenvolvimento do sexo é, de acordo com Devlin e Nagahama (2002), um padrão em espécies gonocoristicos "diferenciados".

Neste estudo concluímos que a temperatura teve influência no processo de diferenciação gonadal, alterando o período da diferenciação que se iniciou aos 150 DAE a 25ºC e aos 170 DAE aos 29ºC, originando ovários. Apenas a 29ºC houve a diferenciação em testículos com início aos 190 DAE. Desta forma, a temperatura mais elevada (29ºC) intensificou o processo de diferenciação em ovários desta espécie e a partir dos 190 DAE proporcionou maiores médias de P e CP. A incubação dos peixes durante o processo de diferenciação é uma excelente alternativa para intensificar o processo de

diferenciação e obter maior número de fêmeas, uma vez que a espécie apresentou 100% de sobrevivência e melhores médias de comprimento e peso em temperaturas elevadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho AA, Júlio Júnior HF, Gomes LC, Bini LM, Agostinho CS. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna *In*: Vazzoler AEAM; Agostinho AA; Hahn NS (Ed.). A Planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá: EDUEM, cap.II.4, p.179-208, 1997.

Albrecht MP, Caramaschi EP. Feeding Ecology of *Leporinus friderici* (Teleostei; Anostomidae) in the Upper Tocantins River, Central Brazil, before and after Installation of a Hydroelectric Plant. Stud Neotrop Fauna Environ. 38(1):33-40, 2003.

Amaral Júnior, H. Manual de reprodução de peixes de água doce com cultivo comercial na Região Sul do Brasil. Florianópolis: Epagri, 2007. 53p. (Epagri. Boletim Técnico,136).

Andrade, D.R; Vidal Jr, M.V. Novas observações sobre a desova induzida do piau-vermelho (*Leporinus copelandii*), STEINDACHNER, 1875). In: Encontro da Associação Mineira de Aquicultura, 9, Belo Horizonte, Anais, p.31. 1991.

Baroiller JF, D'Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish. Comparative Biochemistry and Physiology, C. 130:399-409, 2001.

Baroiller JF, Guigen Y, Fostier A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. Cellular Molecular Life Sciences. 55:910-931, 1999.

Billerbeck JM, Schultz ET; Conover DO. Adaptive variation in energy acquisition and allocation among latitudinal populations of the Atlantic silverside. Oecologia 122:210-219, 2000.

Bizzotto PM. Trânsito de peixes na escada da UHE-Igarapava, Rio Grande, Alto Paraná. Dissertação de Mestrado em Zoologia de Vertebrados, PUC Minas, Belo Horizonte, p. 52, 2006.

Bogart MH. Sex determination: a hypothesis base on steroid ratios. Journal of Theoretical Biology, London, GB, Academic Press, v. 128, p. 349-357, 1987.

DAEE. Departamento de Águas e Energia Elétrica. Caracterização dos recursos hídricos no Estado de São Paulo. São Paulo: DAEE, 1984. 175p.

Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208:191-364, 2002.

Durães R, Pompeu PS, Godinho AL. Alimentação de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, anostomidae) durante a formação de um reservatório no sudeste do brasil. Iheringia. 90:183-191, 2001.

Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. The gonadal steroids. *In*: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. (eds.). Fish Physiology. New York, US: Academic Press, v. 9a, p. 277-372, 1983.

Garavello JC. Revisão taxonômica do gênero *Leporinus* SPIX, 1829 (Ostariophysi, Anostomidae). Tese (USP), São Paulo, Brasil, 1979.

Graeff A, Segalin CA, Pruner EM, Amaral Junior H. Produção de alevinos de jundiá (Rhamdia quelen). Florianopolis: Epagri, 2008. 34p. (Epagri. Boletim Tecnico, 140).

Gotthard K. Growth strategies of ectothermic ani-mals in temperate environments. *In* Atkinson D, Thorndyke M. (Eds.) Environment and animal development: genes, life histories and plasticity. BIOS Scientific, Oxford. 287-303, 2001.

Guraya SS. Comparative cellular and molecular biology of testis in vertebrates. Trends in endocrine, paracrine and autocrine regulation of structure and functions. Enfield, UK: Science Publishers Incorporated, 91p., 2001.

Hayashi Y, Kobira H, Yagamuchi T, Shiraishi E, Yazawa T, Hirai T, Kamei Y, Kitano T. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. Mol Reprod Dev.77:679-686, 2010.

Hunter GA, Donaldson EM. Hormonal sex control and its application to fish culture. *In*: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. (Edit), Fish Physiology. Vol. IX. Reproduction. Part B. Behavior and Fertility Control. Academic Press, New York, pp. 223-303, 1983.

Lopes CA, Benedito-Cecilio E, Agostinho AA. The reproductive strategy of Leporinus friderici (Characiformes, Anostomidae) in the Paraná River basin: effect of reservoirs. Rev Bras Biol, 60(2):255-266, 2000.

Nakamura M, Kobayashi T, Chang XT, Nagahama Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. Journal of Experimental Zoology, New York, US. 281:362-372, 1998.

Navarro-Martín L, Viñas J, Ribas L, Díaz N, Gutiérrez A, Di Croce L, Piferrer F. DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. PLoS Genet 7(12):e1002447, 2011.

Nomura H. Biologia da piava, Leporinus copelandii Steindachner, 1875 do Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo. Tese de Doutoramento, III + 79 pp., UNICAMP, Campinas, 1970.

Ospina-Álvarez, N., Piferrer, F., 2008. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. PloS ONE 3 (7), e2837. doi:10.1371/journal.pone.0002837.

Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, 197: 229-281, 2001.

Present TMC; Conover DO. Physiological basis of latitudinal growth differences in Menidia menidia: variation in consumption or efficiency? Funct. Ecol. 6: 23-31, 1992.

Rêgo ACL, Pinese OP, Magalhães PA et al. Relação peso-comprimento para Prochilodus lineatus (Valenciennes,1836) e Leporinus friderici (Bloch,1794) (Characiformes) no reservatório de Nova Ponte – EPDA de Galheiro, rio Araguari, MG. Rev Bras Zoo,10(1):13-21, 2008.

Rougeot C, Krim A, Mandiki SNM, Kestemont P, Melard C. Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, Perca fluviatilis. Theriogenology. 67:1046–1052, 2007.

Shen ZG, Wang HP. Molecular players involved in temperature-dependent sex determination and sex differentiation in Teleost fish. Genetics Selection Evolution. 46:26, 2014.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr. Rev. 15:342-355, 1994.

Strüssmann CA, Nakamura M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. Fish Physiol. Biochem. 26:13-29, 2002.

Suplicy FM (2007) Freshwater fish seed resources in Brazil. *In*: Bondad-Reantaso MG, editor. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, No. 501, FAO, Rome. pp. 129-143.

Van Winkoopl A, Timmermans LPM, Goos HJTh. Stimulation of gonadal and germ cell development in larval and juvenile carp (Cyprinus carpio L.) by homologous pituitary extract. Fish Physiology and Biochemistry. 13(2):161-171, 1994.

Vaz MM, Torquato VC, Barbosa NDC. Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande. Belo Horizonte, CEMIG e CETEC, 144p, 2000.

Vernetti CHMM, Rodrigues MDN, Perez GHJ, Perez CC, Moreira CGA, Nlewadim AA, Moreira HLM. Genes involved in sex determination and the influence of temperature during the sexual differentiation process in fish: A review. African Journal of Biotechnology. 12(17):2129-2146, 2013.

4. COMENTÁRIOS FINAIS

No manuscrito I observamos que a baixa concentração de extrato bruto de hipófise de carpa resultou em desempenho reprodutivo satisfatório e obtenção de embrião de matrizes de *L. friderici*. Como perspectivas futuras concluiremos as análises correspondentes aos níveis de esteroides plasmáticos de cada hormônio indutor, em cada concentração utilizada, para dessa forma elucidarmos de maneira apropriada as respostas de cada fêmea em decorrência das doses utilizadas.

No manuscrito II observamos que *L. friderici* mantidos em temperatura mais elevada (29ºC) influenciou no aumento do peso corporal e comprimento padrão, intensificou a diferenciação gonadal e foi mais eficiente na obtenção de um maior número de fêmeas, em relação à temperatura mais amena (25ºC). Dessa forma, a expressão do *Cyp19a1a* nos auxiliará a entender os mecanismos responsáveis pela diferenciação sexual no *L. friderici*. Visto que, em muitas espécies de vertebrados existe uma interferência direta da temperatura na transcrição desse gene.