

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

**Uso de implantes com hormônio liberador de
gonadotrofina em fêmeas e avaliação do
sêmen durante a estação reprodutiva de pacu
(*Piaractus mesopotamicus*)**

Rafael Yutaka Kuradomi

Jaboticabal, SP
2013

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

**Uso de implantes com hormônio liberador de
gonadotrofina em fêmeas e avaliação do
sêmen durante a estação reprodutiva de pacu
(*Piaractus mesopotamicus*)**

Rafael Yutaka Kuradomi

Orientador: Dr. Fausto Foresti

Coorientador: 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, SP
2013

K96u Kuradomi, Rafael Yutaka
Uso de implantes com hormônio liberador de gonadotrofina em fêmeas e avaliação do sêmen durante a estação reprodutiva de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Rafael Yutaka Kuradomi. -- Jaboticabal, 2013
iii, 107 p. : il.; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2013
Orientador: Fausto Foresti
Coorientador: Sergio Ricardo Batlouni
Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Luiz Renato de França, Maria Inês Borella, Rafael Henrique Nobrega
Bibliografia

1. *Piaractus mesopotamicus*. 2. sGnRHa. 3. Maturação ovariana. 4. Características seminais. 5. Reespermição. 6. Estação reprodutiva. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Uso de implantes com hormônio liberador de gonadotrofina em fêmeas e avaliação do sêmen durante a estação reprodutiva de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

AUTOR: RAFAEL YUTAKA KURADOMI

ORIENTADOR: Prof. Dr. FAUSTO FORESTI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI

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

Prof. Dr. FAUSTO FORESTI

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu

Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LUIZ RENATO DE FRANÇA

Departamento de Morfologia / Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. MARIA INÊS BORELLA

Departamento de Histologia e Embriologia / Universidade de São Paulo

Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NOBREGA

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu

Data da realização: 11 de julho de 2013.

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência.”

Augusto Cury

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss

“Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas.”

Ayrton Senna

DEDICATÓRIAS

DEDICO

Aos meus pais Yoshinobu e Rieko, e aos meus irmãos Clayton e Igor, por todo o carinho, incentivo e amor incondicional.

OFEREÇO

A minha namorada Milene, pelo companheirismo, incentivo, reconhecimento, paciência e principalmente pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve, está e estará ao meu lado em todos os momentos, me protegendo, orientando, confortando e abençoando.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pela orientação e contribuições para o desenvolvimento deste estudo e na minha formação. Também, pelo incentivo, oportunidade e por acreditar e confiar em mim.

Ao Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni, que me acolheu como seu coorientado (orientado) mesmo não me conhecendo, e efetivamente fez-se presente em todas as etapas deste trabalho. Meu sincero muito obrigado, pela sua amizade, conselhos, apoio, paciência, oportunidades e por me ensinar como e ser, sendo um exemplo profissional. E também pelos bons momentos de convívio fora do ambiente de trabalho, como em “eventos” e CAFÉ na cantina!

A Prof^ª. Dra. Renata Guimarães Moreira, por receber, colaborar e orientar no desenvolvimento das análises hormonais deste trabalho. A ela e toda a sua equipe (Aline, Cris, Amanda, Gabi, Jaboti, Kadu, Bruno, Paulo, Vanessa e Tiago) agradeço a ajuda, amizade e convívio. E ao meu amigo Renato M. Honji, eu agradeço também pelas ajuda nas análises e por ter me ajudado com o visto.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Furlan, pela colaboração, orientação para o sequenciamento dos genes. Também agradeço pelos ensinamentos, conselhos, convívio dentro da universidade, assim como fora dela.

Ao Prof. Dr. Eduardo A. de Almeida, e a Dra. Lucilene R. Maschio, pelas colaborações e orientação para as análises do ensaio cometa. Também agradeço por me receberem em Rio Preto.

Ao Prof. Dr. Jeffrey F. Lui, pela oportunidade de realizar os estágios docência sobre sua supervisão e também por abrir as portas de seu laboratório, pelos conselhos, ajuda e amizade.

A Prof^ª. Dra. Marcia R. F. Machado e a Prof^ª. Dra. Laura S. O. Nakaghi, por terem permitido usar o laboratório e seus equipamentos. Além de serem pessoas super acessíveis e sempre dispostas a ajudar.

A Prof^ª. Dra. Irene B. F. Vicentini, que quando coordenadora do curso de Pós-Graduação em Aquicultura, sempre ajudou e incentivou para a realização deste trabalho, principalmente no início de meu doutorado.

A Prof. Dra. Fabiana Pilarski, que sempre deixou o seu laboratório a disposição, além de juntamente com seus alunos José Dias Neto, Santiago B. de Pádua, e também agora Prof. Dr. Róberson Sakabe, fazerem diagnósticos patológicos dos peixes, e o mais importante, a amizade.

Ao Prof. Dr. Pedro Luís da C. A. Alves, e também a Dra. Mariluce P. Nepomuceno, por me ajudarem a quantificar a osmolaridade do plasma seminal. Minha promessa de submeter o artigo a uma revista internacional de impacto será cumprida.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, e a técnica (Paulo e Renata) que me ajudaram a analisar os íons seminais, assim como aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário, em especial ao senhor Eugênio, pela atenção e ajuda.

Aos Professores, Dr. Rafael H. Nóbrega e Dra. Elisabeth C. Urbinati, que foram membros da banca examinadora de minha qualificação, agradeço pelas sugestões e correções que ajudaram a melhorar este estudo.

Aos Professores, Dra. Elisabeth C. Urbinati, Dr. Luiz R. de França, Dra. Maria I. Borella, Dr. Rafael H. Nóbrega, por aceitarem serem membros da bancada de defesa e por suas valiosas contribuições e sugestões para a tese. Assim como o Dr. Eduardo A. de Almeida e Dra. Elizabeth Romagosa, como suplentes

Ao Rafael H. Nóbrega (Rafa), também agradeço por ter me ajudado quando fui a Holanda, nosso convívio foi curto, no entanto, o suficiente para que me ajudasse a me ambientar, enturmar e acomodar.

I'd like to say some words of acknowledgement for my Dutch (German) co-supervisor, Dr. Rüdiger W. Schulz, for had received me in his lab, and providing all the support and supervision during my PhD internship. I'm very glad to had experienced to been working as member of your team, and all opportunities, knowledge and results generated. And last, but no least, for friendship. Without exception these words also apply to Dr. Jan Bogerd (Dutch - Dutch).

I also would like to thank Utrecht University and all staff, the friends of mine (Roberto Daltro Vidal de Souza Moraes, Michelle Carolina de Melo, Clara Kammüller, Ruben Schmidt, Nuria Esther Gómez González, Kimberly Semeleer, Pim Boute and Marina Buitelaar) for friendship and also for had been helping me at my works, translating letters in Dutch , drinking, lunch, Rüdiger's pie and a LOT of chatting time.

Aos meus colegas...? Aos meus AMIGOS que fazem e fizeram parte do Laboratório de Reprodução de Peixes, Thiago G. de Souza, Patrick Hainfellner, Eduardo C. Urbinati, Guilherme A. de Freitas, Daniel G. Figueiredo, Marianne Schorer, Mario E. M. Gutierrez, Camila e Carolina S. Nascimento, Thiago S. Pereira, Daniela O. de Godoy e Rodrigo M. Garcia, pela ajuda, amizade e companheirismo, em especial ao amigos das “antigas” pelos esforços e ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos amigos de outros setores do centro e departamentos da FCAV, que não foram listados, mas não são menos importantes, pois sempre pude contar com vocês e com sua amizade.

Aos funcionários Mauro Dias, Valdecir F. de Lima, e Marcio R. Reche, Marcio A. dos Santos, Silvia R. L. de Laurentiz e os demais não listados (faxineiras, motorista, jardineiro, administrativos e outros), pela grande ajuda concedida, empréstimo de materiais, manejo, ensinamentos e amizade.

Ao histotécnico Orandir Mateus pela ajuda na preparação de lâminas e cortes histológicos, empréstimo de materiais e reagentes, e principalmente nos ensinamentos não apenas sobre a histologia, mas também pela amizade.

Aos secretários David O. Lorente, Fátima A. B. Braga e Mayara V. Vidal e Veralice Cappatto por sempre me ajudarem com os prazos, normas e outros, e também pela amizade.

Aos meus parentes, da família Ishizuka (em especial ao meu primo Fábio), Kuradomi, Izeri e Kohiyama.

Aos meus amigos de longa data, Carlos A. Fugita, Carlos F. C. Lanes, Fagner A. Vieira, Fernando C. Tavernari, Helio K. Nakatani e Waldomiro S. Carvalho Jr, pela amizade e apoio dado por todos esses anos, mesmo que a comunicação já não mais seja tão frequente.

Teria muito mais pessoas a serem aqui mencionadas, mas infelizmente não há espaço suficiente para todos, portanto quero dizer a TODOS que sou muito grato a vocês!

Muito Obrigado!

皆さん、
お世話になりました。
ありがとうございました。

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Auxílios a Pesquisa, Processo nº 2010/05286-1.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Bolsa de Doutorado, Processo nº 2010/00825-1.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), Processo: BEX 8501/11-4.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
APOIO FINANCEIRO	4
LISTA DE SIGLAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1. Panorama atual sobre a produção e reprodução do pacu em cativeiro	11
1.2. Técnicas convencionais de indução hormonal	14
1.3. Uso de implantes de liberação lenta para reprodução	15
1.4. Controle endócrino da reprodução	17
1.5. Foliculogênese e maturação ovariana.....	20
1.6. Estrutura testicular e espermatogênese em teleósteos.....	23
1.7. Qualidade do sêmen e sua avaliação	26
2. JUSTIFICATIVAS	29
3. OBJETIVO	30
 MANUSCRITO I	
Uso de implantes com hormônio liberador de gonadotrofina para maturação ovariana em pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	31
Resumo.....	32
Abstract.....	33
1. Introdução	34
2. Material e Métodos.....	36
3. Resultados	43
4. Discussão.....	45
5. Agradecimentos	50
6. Referências	50

MANUSCRITO II

Reespermição e características seminais de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) durante o período de reprodução	65
Resumo.....	66
Abstract.....	67
Introdução	68
Material e métodos.....	69
Resultados	77
Discussão.....	79
Agradecimentos	83
Referências bibliográficas	83
3. CONCLUSÕES GERAIS	94
4. REFÊRENCIAS COMPLEMENTARES	95

LISTA DE SIGLAS

AC	Alvéolo Cortical
AT	Atrésicos
ANOVA	Análise de variância
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CP	Comprimento Padrão
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
DA	Dopamina
dci	Dias Após a Introdução dos Implantes
DE	Densidade Espermática
DHP	17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Extremamente Hemorrágica
E ₂	Estradiol
<i>ef1a</i>	Gene do Fator de alongação 1 Alfa
EHC	Extrato Bruto de Hipófise de Carpa
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fecundidade Absoluta
Fsh	Hormônio Folículo Estimulante
<i>fshb</i>	Gene da Subunidade Beta do Hormônio Folículo Estimulante
Gh	Hormônio do Crescimento
<i>gh</i>	Gene do Hormônio do Crescimento
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GnRH α	Análogo do Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GtHs	Gonadotrofinas
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown
H	Hemorrágica
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
ID	Índice de Danos de DNA
IHS	Índice Hepatosomático
IGS	Índice Gonadosomático
IVS	Índice Viscerosomático

IGV	Índice de Gordura Visceral
K	Fator de Condição
Lh	Hormônio Luteinizante
<i>lhb</i>	Gene da Subunidade Beta do Hormônio Luteinizante
L _s	Comprimento Padrão
N	Não-Hemorrágica
PE	Produção Espermática
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGCs	Células Germinativas Primordiais
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-qPCR	PCR Quantitativo em Tempo Real
sGnRHa	Análogo do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas do Salmão
T	Testosterona
Tgfβ	Fator de Transformação do Crescimento Beta
V	Vitelogênicos
VE	Volume Espermiado
Vtg	Vitelogenina
W _A	Largura do Abdômen
W _T	Massa Total
11-KT	11 Cetotestosterona
17α-OHP	17α-Hidroxiprogesterona

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de induzir a sincronização da maturação ovariana em um plantel de matrizes de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) por meio de uso de implantes com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas do salmão (sGnRH α). Além disso, complementarmente ao estudo com as fêmeas, avaliamos as características seminais dos reprodutores ao longo do ciclo reprodutivo e a possibilidade de reespermiação. Para tal, implantes de sGnRH α foram utilizados em fêmeas, reprodutores foram espermiados ao longo da estação reprodutiva e a reespermiação foi realizada em machos espermiados no início e novamente no meio da estação. Variações temporais e entre grupos experimentais na expressão gênica do *hormônio do crescimento (gh)* e *subunidade beta do hormônio luteinizante (lhb)* e do *folículo estimulante (fshb)*, bem como as concentrações plasmáticas de esteroides gonadais foram determinadas em machos e fêmeas e utilizadas como ferramentas auxiliares na interpretação dos resultados. Nas fêmeas, aos 35 dias após a introdução do implante (durante o período de desova) as expressões gênicas da *lhb* e do *fshb* estavam aumentadas nas tratadas e inibidas nas controles, respectivamente, sugerindo um efeito indutor do *lhb* pelo implante. Nos machos, o volume de sêmen liberado aumentou ao longo do período reprodutivo, no entanto, os índices relacionados com a qualidade dos espermatozoides, principalmente a qualidade do DNA, que decresceu do começo para o término da estação. A expressão do *lhb* e *gh* estavam aumentadas no grupo do final da estação em relação ao grupo reespermiado, sugerindo uma associação entre a expressão gênica e o estágio de maturação dos testículos. Além disso, elevações substanciais de 11-cetotestosterona durante a indução hormonal, no início da estação reprodutiva e nos animais reespermiados, correlacionaram-se com sêmen de boa qualidade. Concluímos que o uso de implantes de sGnRH α pode elevar a frequência de fêmeas aptas na época de desova. A utilização do sêmen no final da estação reprodutiva deve ser evitada e a reespermiação é uma alternativa para manter a qualidade do sêmen do pacu.

Palavras-chave: Pacu, sGnRH α , maturação ovariana, características seminais, reespermiação, estação reprodutiva.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the possibility of ovarian maturation synchronization in a breeding herd of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) by using slow-release implants with salmon gonadotropin releasing hormone analogue (sGnRHa). Furthermore, in addition of female's study, we evaluated the seminal characteristics throughout of the breeding season and the possibility of restripping. In this regard, females were implanted with sGnRHa pellets, and males were spermated during of the breeding season and restripping were performed in males spermated at the beginning and spermated again at the middle of the season. To help in understanding the results, temporal variations between experimental groups of *growth hormone (gh)*, luteinizing hormone beta subunit (*lhb*) and *follicle-stimulating hormone beta subunit (fshb)* gene expressions, and gonadal steroids concentrations were determined in males and females. In females, 35 days after pellets implantation (during the spawning period) the gene expression of *lhb* and *fshb* were increased in the treated and inhibited in the controls group, respectively, suggesting an *lhb* inducing effect by implant. In males, released milt volume increased throughout the breeding season, however, the indices related to sperm quality, especially to the DNA quality, were lower in the end than beginning of the season. The expressions of *lhb*, and *gh* were increased for the end season group against the reespermiado group, suggesting an association between gene expression and the maturation stage of the testes. Furthermore, the substantial increases of 11-ketotestosterone after hormonal induction in the beginning and restripping group correlated with good semen quality. We conclude that the using of implants may increases the frequency of the apt females in the spawning season. The using of semen at the end of the breeding season should be avoided and restripping is an alternative to maintain the quality of pacu semen.

Key words: Pacu, sGnRHa, ovarian maturation, seminal characteristics, restripping, breeding season.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Panorama atual sobre a produção e reprodução do pacu em cativeiro

No Brasil, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é considerado uma das espécies de águas continentais mais nobres. Juntamente com o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus híbridos recíprocos representam 24,6% da produção aquícola nacional (MPA, 2010). No cenário internacional, particularmente em países asiáticos, o pacu figura entre as espécies introduzidas e estabelecidas com sucesso (FAO, 2012). A consolidação do cultivo desta espécie na aquicultura nacional e internacional se deve à características zootécnicas favoráveis, tais como: boa tolerância a mudanças no teor de oxigênio e pH da água e rápido crescimento sob uma variedade de condições (2.2-2.6 vezes mais rápido que carpas) (Gelman et al., 2004). O pacu pode alcançar 60 a 83 cm de comprimento (Britski et al., 2007) e a idade e tamanho de primeira maturação ocorrem respectivamente com cerca de 3 anos e 34 cm de comprimento total (Ferraz de Lima et al., 1984).

O pacu é uma espécie reofílica (migradora), apresenta ciclo reprodutivo sazonal e desova total (revisão em Zaniboni-Filho & Weingart, 2007). Assim, realiza migrações reprodutivas em seu ambiente natural que culminam com a desova, num processo que compreende a liberação e fertilização dos gametas (Lima et al., 1991; Bock & Padovani, 2000). O processo de maturação das gônadas (vitelogênese) ocorre entre setembro e outubro (Lima et al., 1991), e fêmeas em maturação avançada são observadas entre os meses de outubro e janeiro (Lima et al., 1991). A desova ocorre entre novembro e janeiro (Urbinati et al., 2010).

A desova em condições de cultivo dos peixes reofílicos sul-americanos só pode ser obtida mediante indução hormonal (revisão por: Zaniboni-Filho & Weingart, 2007). No caso do pacu, esta tem sido obtida com uso de diversos tipos de hormônios como o hCG (gonadotrofina coriônica humana) (Romagosa et al., 1990), GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) (Carolsfeld et al., 1988a) e EHC (extrato bruto de hipófise de carpa) (Godinho & Godinho, 1986; Bock & Padovani, 2000). No entanto, apesar da técnica de indução hormonal estar sendo usada ao longo de décadas, irregularidades e deficiências ainda são muito

frequentes no processo de produção de alevinos de teleósteos reofilicos sul-americanos.

Dentre estas espécies, o pacu é a que apresenta maior inconstância em procedimentos de indução hormonal (Criscuolo-Urbinati et al., 2012). Mesmo os produtores mais experientes têm obtido resultados pouco satisfatórios com a desova desta espécie. Os relatos mais comuns são sobre fêmeas que não respondem aos tratamentos hormonais (não desovam) e muito frequentemente apresentam ovócitos “empedrados” no momento da extrusão. Neste sentido, devem ser considerados alguns fatores que contribuem negativamente para o processo de desova induzida, tais como: a falta de informações básicas sobre a biologia da espécie (principalmente de caráter científico), o desconhecimento sobre a influência do clima sobre o processo reprodutivo, falhas no manejo dos reprodutores ao longo do ano e durante o processo de indução hormonal (Mylonas et al., 2010; Bobe & Labbé, 2010; Guerreiro et al., 2009) e erros na seleção dos reprodutores adequados, comumente são considerados “aptos” apenas por exames visuais e palpação (Figura 1).

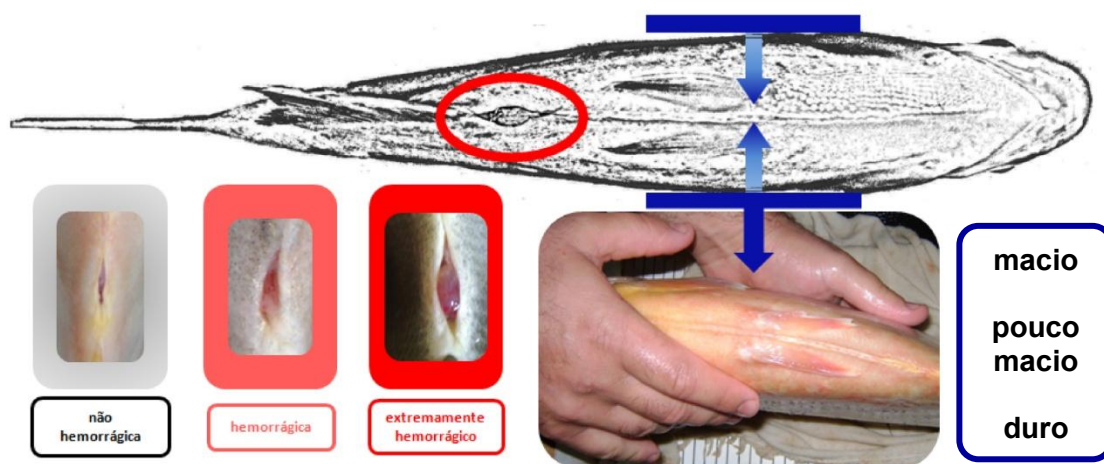


Figura 1 – Esquema ilustrativa do método rotineiro (mais utilizado pelos produtores) de seleção de fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*) para a indução hormonal.

Neste contexto, uma característica que desperta a atenção nesta espécie é a assincronia no processo natural de desenvolvimento gonadal entre os indivíduos de um mesmo plantel de fêmeas. No momento da escolha das fêmeas “aptas” à indução hormonal, observações realizadas no campo reportam grandes diferenças em seus aspectos externos, de modo que na mesma triagem

encontram-se fêmeas com as gônadas completamente imaturas (ventre duro e com a papila não hemorrágica), ou parcialmente desenvolvidas (pouco macio e hemorrágica), até aqueles considerados aptos (macio e extremamente hemorrágica), além de diversas gradações entre os tipos anteriormente mencionados. Mais agravante ainda, são os resultados negativos obtidos mesmo com fêmeas maduras (consideradas “aptas”), as quais frequentemente não liberam seus ovócitos, que permanecem aderidos ao estroma ovariano após o tratamento hormonal.

As razões para estes resultados indesejáveis não estão ainda completamente esclarecidas do ponto de vista científico, e pode se tratar apenas de uma característica da espécie. Em condições de cultivo, a existência de assincronia no estágio de maturação gonadal das fêmeas exige um manejo excessivo no viveiro à procura de exemplares “aptos”. O arrasto sucessivo estressa demasiadamente as fêmeas, causando perda de escamas, aumento de susceptibilidade às enfermidades e até morte. O manejo constante dos viveiros também coloca em suspensão elevadas quantidades de matéria orgânica (Brooks et al., 1997). Por diversas razões, mas principalmente por se dedicarem a inúmeras atividades, a maioria das estações de piscicultura não possuem viveiros disponíveis para implantarem um processo de rodízio de seleção de fêmeas, o que minimizaria o manejo excessivo.

Neste sentido, deve ser mencionado que durante os arrastos em busca de fêmeas aptas, o estresse causado pode desencadear um processo de regressão ovariana e atresia ovocitária (Brooks et al., 1997). Este processo de degeneração ovocitária afeta quali e quantitativamente a desova, podendo até mesmo inibir completamente a reprodução (para revisão ler Schreck, 2010). Desta forma, a indução a maturação ovariana, com a possibilidade de sincronização deste processo, traria à disposição do produtor um número suficiente de fêmeas aptas, em um momento previsível, o qual poderia ser determinado com antecedência pelo estabelecimentos de técnicas e protocolos para esta finalidade.

Desta forma, com base no conhecimento fisiológico e bioquímico disponível sobre a maturação dos ovócitos de teleósteos (para revisão ler: Zohar & Mylonas, 2001; Nagahama & Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2010; Mylonas et al., 2010), uma alternativa para a antevisão segura do momento certo para a indução das matrizes de pacu seria promover a sincronização do processo de maturação

ovariana do plantel. Neste contexto, produtos comerciais, já testados em salmonídeos, promovem a desova e a sincronização das fêmeas. O *Ovaplant*® (Syndel/ Canadá - <http://www.syndel.com>) é um produto comercial no qual o GnRH análogo ao do salmão (sGnRHa) é introduzido em um implante de colesterol que propicia a liberação lenta e gradativa do hormônio. De acordo com o fabricante, nas espécies testadas (predominantemente salmonídeos) é possível induzir e sincronizar a maturação das fêmeas e até mesmo controlar o reinício da maturação ovariana após a desova (<http://www.syndel.com> – acessado: 20/01/2013).

A indução da gametogênese mediante estimulação hormonal também foi obtida em outros grupos de peixes, como é o caso da *Anguilla japonica* com uso crônico de hCG e extrato bruto de hipófise de salmão (Kagawa et al., 2005). No entanto, a indução antecipada e/ou tardia pode ser prejudicial à reprodução (Gardes et al., 2000; Carral et al., 2003). Desta forma, o protocolo de indução a maturação para uma determinada espécie provavelmente envolve diversas etapas, sendo necessário preliminarmente avaliar a possibilidade de resposta da espécie frente ao tratamento e posteriormente uma adequação da concentração dos hormônios empregados.

1.2. Técnicas convencionais de indução hormonal

Existem vários tipos de substâncias químicas, princípios ativos diferenciados e extratos utilizados na indução hormonal de teleósteos, no entanto o mais empregado e com maior aceitação no Brasil é o EHC (Bock & Padovani, 2000; Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007). O método de hipofisação foi desenvolvido na década de trinta, tendo como um dos seus principais precursores Rodolfo Von Ihering (Von Ihering & Azevedo, 1936). Esta técnica foi originalmente desenvolvida a partir da aplicação de hipófise de peixes maduros, a qual promove a retomada da meiose e a maturação final do ovócito (Von Ihering & Azevedo, 1936; Nagahama & Yamashita, 2008; Mylonas et al., 2010).

No procedimento rotineiro de hipofisação, as fêmeas recebem duas doses de EHC (0,5 e 5,0 mg/ kg) com intervalo de 10 a 12 horas (Cecarelli et al., 2000). A eficácia deste método é comprovada em peixes reofílicos sul-americanos

pertencentes às famílias Anostomidae, Curimatidae e Prochilodontidae (Sato et al., 2000; Sampaio & Sato, 2007). Em alguns casos, o intervalo entre a primeira e a segunda dose é expandido para 24 ou até 31 horas (Brasil, 2001). Outra variação no processo de hipofisação é a aplicação de uma dose extra de EHC (*priming* ou dose preparatória). Neste método, as fêmeas recebem uma dose de EHC (0,25 mg/kg) 1 a 3 dias antes do tratamento convencional, que pode melhorar o desempenho reprodutivo (Zaniboni-Filho & Barbosa, 1996). Existe ainda a combinação de diferentes hormônios, como o EHC associado ao GnRH e/ou hCG ou até mesmo a combinação de diferentes fontes de extrato de hipófises (Silva-Filho 1981; Peter et al., 1988; Dumont-Neto et al., 1997).

A eficácia das associações é controversa e no caso do cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*, o uso de hCG associado à EHC não promoveu resultados favoráveis (Leonardo et al., 2004). Por outro lado, devido a dopamina (DA) exercer uma ação inibitória sobre a liberação das gonadotrofinas (GtHs) em teleósteos, um método de indução hormonal chamado “LinPe” foi desenvolvido com base na combinação do GnRH com um antidopaminérgico (p. ex. domperidona), o qual é atualmente amplamente utilizado na aquicultura (Dufour et al., 2010).

Nos machos, os efeitos conhecidos da indução hormonal (p. ex. hipofisação) são principalmente o aumento do volume de ejaculado e à indução à espermição (Mylonas & Zohar, 2001; Godinho, 2007; Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007; Mylonas et al., 2010).

1.3. Uso de implantes de liberação lenta para reprodução

Muitas espécies de teleósteos requerem múltiplas aplicações de hormônio para promover a maturação ovariana e ovulação de forma satisfatória em condições de cultivo (Dabrowski et al., 1994; Mylonas et al., 1992; Pankhurst et al., 1996; Slater et al., 1994). Contudo, a necessidade de múltiplas aplicações hormonais em peixes mantidos em ambientes artificiais (viveiros e gaiolas) exige manejo excessivo (provocando estresse e morte de fêmeas) e altos custos com mão de obra, principalmente em espécies de grande porte (p. ex. atum) (Mylonas

& Zohar, 2001, Mylonas et al., 2010). Desta forma, uma opção para evitar estes entraves é o uso de implantes de liberação lenta.

Nas duas últimas décadas, foram desenvolvidos diversos tipos de implantes para uso em espécies de teleósteos de interesse para a aquicultura (Mylonas & Zohar, 2001). A matriz dos implantes pode ser de colesterol, espuma vinílica acetinada, polímeros de ácido lático-co-ácido glicólico ou polianidridos do ácido sebácico com um dímero de ácido graxo (Weil & Crim, 1983; Breton et al., 1990; Chang et al., 1995; Mylonas et al., 1995, 1997a, 2007; Mylonas & Zohar, 2001; Barbaro et al., 2002;). Embora existam variações na matriz dos implantes, o hormônio empregado para indução da gametogênese, ovulação ou espermição é quase sempre o GnRHa (Mylonas et al., 2010). A preferência pelo GnRHa está associada à particularidades desta molécula, tais como: não possuir caráter espécie-específico como ocorre com o hormônio luteinizante (Lh); apresentar alta similaridade estrutural com os GnRHs endógenos; apresentar reduzido potencial para transmissão de doenças (por serem sintéticos), ao contrário de extrato de hipófise; e estimular a liberação dos GtHs endógenos, pois agem sobre a hipófise (Le Gac et al., 1993; Weber et al., 1995; Cyr & Eales, 1996; Negatu et al., 1998; Lethimonier et al., 2004, Mylonas & Zohar, 2001; Mylonas et al., 2010).

O primeiro implante desenvolvido e testado em teleósteo foi o GnRHa em matriz de colesterol (Carolsfeld et al., 1988b; Crim et al., 1988; Sherwood et al., 1988). O tempo de ação deste tipo de implante pode variar de 1 a 5 semanas (Crim et al., 1988; Mylonas & Zohar, 2001; Mylonas et al., 2010). Os implantes podem ser classificados em “rápidos” (com <95% de colesterol) ou “lentos” (com >95% de colesterol). Os rápidos liberaram 90% do hormônio em 24 horas (*in vitro*), e mantiveram os níveis de GnRHa elevados durante 2 dias (*in vivo*). Os lentos liberaram apenas 20% do hormônio nas primeiras 24 horas e mais 20% nas 5 semanas seguintes (*in vitro*), e mantiveram os níveis de GnRHa elevados durante 4 semanas (*in vivo*) (Carolsfeld et al., 1988b; Crim et al., 1988; Sherwood et al., 1988).

O uso de implantes de liberação lenta de hormônios tem sido amplamente empregado e estudado em espécies de peixes de água doce (Mylonas et al., 1992, 1995) e marinhos (Mylonas et al., 1998a; Forniés et al., 2001; Mañanos et al., 2002; Marino et al., 2003). Os implantes têm sido empregados em espécies com desenvolvimento ovariano sincrônico (Matsuyama et al., 1997; Mylonas &

Zohar, 2001; Brzuska & Bialowas, 2002; Duncan et al., 2003) e assíncrono (Mylonas et al., 1997b, Morehead et al., 1998; Watanabe et al., 2003), incluindo o atum, *Thunnus thynnus* (Mylonas et al., 2007). Na aquicultura, a principal finalidade da administração de implantes de liberação lenta de GnRHa é a estimulação da maturação ovariana (Mylonas & Zohar, 2001) por diversas formas. No linguado *Pseudopleuronectes americanus*, o uso de implantes de GnRHa no início da vitelogênese induziu a elevação dos níveis de testosterona (T) e estradiol (E₂), assim como, o aumento do diâmetro do ovócitos e do índice gonadosomático (IGS) (Harmin et al., 1995). Em *Chanos chanos*, o múltiplo tratamento com implantes de GnRHa intensificou a vitelogênese e espermiogênese, antecipando o período de desova em 2 meses (Lee et al., 1986). A combinação do implante de GnRHa com a domperidona (antagonista de dopamina) em *Mugil cephalus*, foi capaz de intensificar o processo vitelogênico (Aizen et al., 2005).

1.4. Controle endócrino da reprodução

O ciclo reprodutivo dos teleósteos é controlado por um sistema endócrino guiado pelo eixo hipotálamo – hipófise – gônadas, que sintetiza e libera hormônios e neuromoduladores que atuam no processo reprodutivo (Nagahama & Yamashita, 2008; Guerrero et al., 2009; Bobe & Labbé, 2010; Dufour et al., 2010; Lubzens et al., 2010; Mylonas et al., 2010; Schulz et al., 2010; Zohar et al., 2010). Neste processo, o desenvolvimento das gônadas e a maturação e liberação dos gametas ocorrem em sincronia com fatores ambientais, tais como: variação do fotoperíodo, temperatura, chuvas e outros (Tyler & Sumpter, 1996; Trudeau, 2006) (Figura 2).

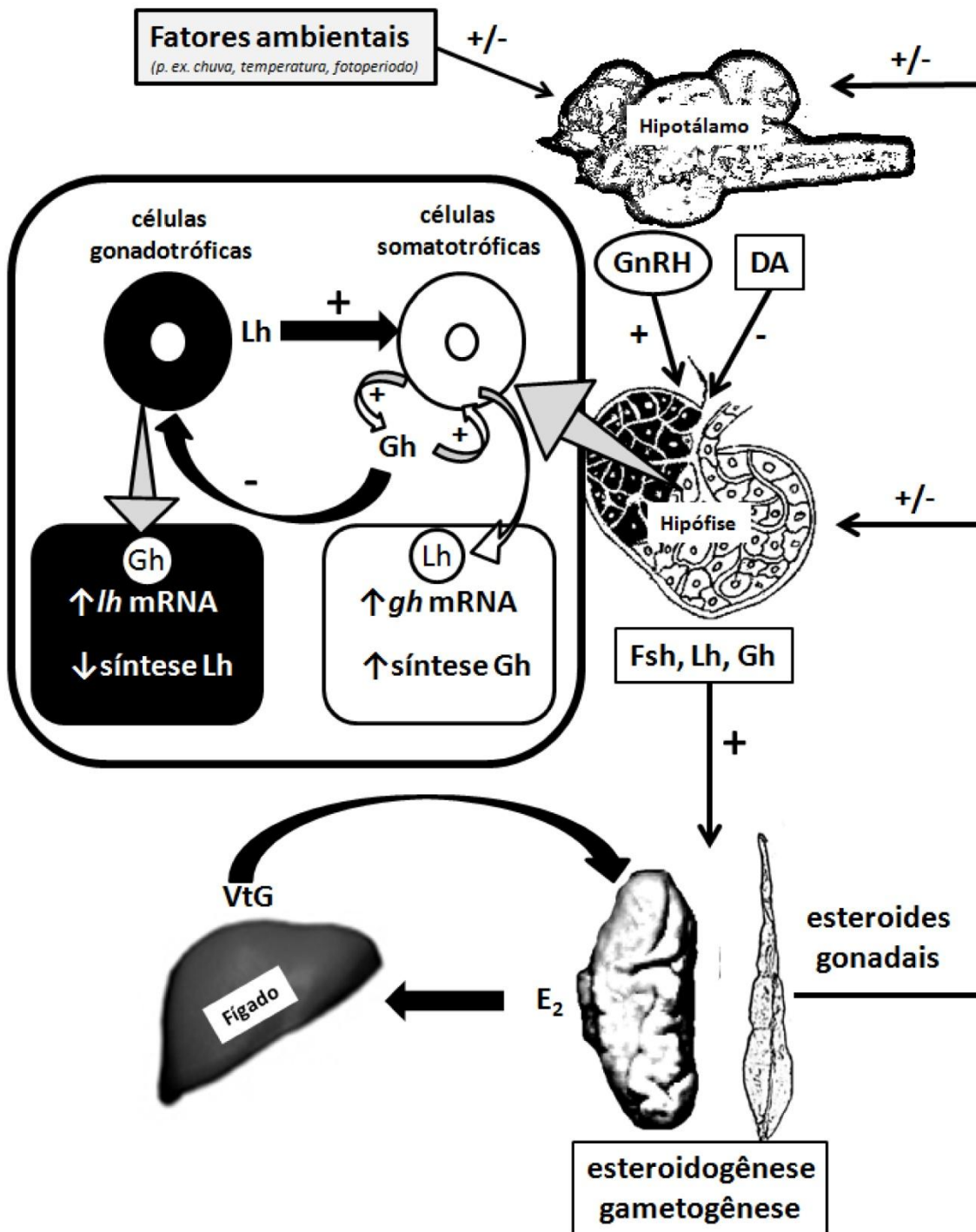


Figura 2 – Esquema ilustrativo do controle neuroendócrino da reprodução pelo eixo hipotálamo – hipófise – gônada em teleostes. Hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), hormônio folículo estimulante (Fsh), hormônio luteinizante (Lh), hormônio do crescimento (Gh), dopamina (DA), estradiol (E₂) e vitelogenina (Vtg).

Dois dos principais “transdutores” endócrinos destas variações ambientais são o GnRH e a DA. O GnRH é considerado o maior indutor da secreção das GtHs, enquanto a dopamina parece controlar de maneira inibitória as ações do

GnRH (Dufour et al., 2010). As GtHs são sintetizadas na hipófise e controlam a reprodução. O hormônio folículo estimulante (Fsh ou GtH I) tem papel conhecido sobre o controle e estimulação da gametogênese (vitelogênese e espermatogênese) e o hormônio luteinizante (Lh ou GtH II) regula e promove a maturação final dos ovócitos, ovulação e o processo de espermição (para revisão ler: Nagahama & Yamashita, 2008; Guerrero et al., 2009; Lubzens et al., 2010; Mylonas et al., 2010; Schulz et al., 2010). Além das GtHs, o GnRH e DA também atuam sobre a síntese e liberação do hormônio do crescimento (Gh), também hipofisário. Similar aos mamíferos, onde o Gh tem sido considerado como uma “co-gonadotrofina”, em teleósteos este participa no eixo gonadotrófico contribuindo na gametogênese e esteroidogênese (Chang & Wong, 2009).

A atuação do Fsh e do Lh sobre os ovários se dá predominantemente sobre as células da teca e da granulosa, estimulando a síntese de T, E₂ e progestágenos. Nos testículos, as GtHs estimulam as células de Leydig a produzirem andrógenos, mais especificamente a 11-cetotestosterona (11-KT), que é um dos principais esteroides da espermatogênese em teleósteos (para revisão ler: Nagahama & Yamashita, 2008; Guerrero et al., 2009; Lubzens et al., 2010; Mylonas et al., 2010; Schulz et al., 2010).

Além de possuir outras funções mais bem conhecidas relacionadas ao crescimento (revisão em Canosa et al., 2007), o Gh atua sobre a hipófise na síntese e secreção de Fsh e Lh (Trudeau, 1997). Em carpa é conhecido que o Gh atua sobre as células gonadotróficas hipofisárias como inibidor na liberação do Lh, porém, indutor para expressão do mesmo. Por outro lado, o Lh atua sobre as células somatotróficas hipofisárias como um indutor da expressão gênica e liberação do Gh (Wong et al., 2006).

Alguns estudos demonstraram o envolvimento do Gh com a reprodução. Em estudo com salmão (*Oncorhynchus masou*; Bhandachi et al., 2003), foi observado que o Gh apresentou alterações na expressão gênica e nas concentrações durante as estações, enquanto, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*; Sumpter et al., 1991; Gomez et al., 1999) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*; Björnsson et al., 1994) o Gh apresentou as maiores concentrações, e/ou expressão gênica, principalmente nos estádios finais da maturação gonadal. Os resultados destes estudos, em especial os que relacionaram o Gh com a

maturação gonadal, sugerem uma possível ação moduladora dos esteroides sobre o Gh.

De fato, corroborando uma possível interação entre os esteroides e o Gh, o tratamento com E₂ teve uma ação indutora nas concentrações séricas do Gh em kingiuo (*Carassius auratus*; Canosa et al., 2002), tilápia (*Oreochromis niloticus*; Malamed et al., 1995) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*; Holloway & Leatherland, 1997). Ainda neste contexto, tratamentos com T e elevações nos níveis de Gh também foram observados em *C. auratus*, porém, para este efeito foi necessário a aromatização do andrógeno (Canosa et al. 2002). Por outro lado, exemplos de salmão do Pacífico (*O. kisutch*) submetidos ao tratamento com os andrógenos T e 11-KT não apresentaram elevações no Gh (Larsen et al., 2004). Desta forma, estes estudos indicam que o Gh pode sofrer influência dos esteroides em sua síntese e liberação. Contudo, a influência parece ser dependente de diversos fatores, dentre eles o tipo de esteroide. Além disto, distintas espécies apresentam diferentes padrões de resposta, como nos estudos com *C. auratus* e *O. kisutch*, que apresentaram respostas distintas em relação a liberação do Gh ao serem tratados com a T.

1.5. Foliculogênese e maturação ovariana

O pacu apresenta desenvolvimento ovocitário do tipo “sincrônico em grupo” (Costa & Mateus, 2009), que se caracteriza pela presença de pelo menos dois lotes de ovócitos (p. ex. pré-vitelogênico e vitelogênico) nos ovários de fêmeas aptas à reprodução (Wallace & Selman, 1981). As características histológicas do processo de maturação ovocitária variam nas distintas espécies de teleósteos já descritos (presença ou não de gota de lipídeo, tamanho e composição dos grânulos de vitelo, presença e frequência e tamanho de alvéolos corticais e outras). No entanto, a sequência dos acontecimentos, relacionados às divisões meióticas e às fases de crescimento primário e secundário, apresenta um padrão definido, salvo algumas particularidades.

Este processo tem início no momento da diferenciação da gônada indiferenciada em ovário ou testículo, normalmente semanas após o nascimento (Devlin & Nagahama, 2002). O processo de diferenciação gonadal é

extremamente complexo e envolve a ativação de diversos genes e fatores de transcrição específicos (Devlin & Nagahama, 2002; Manolakou et al., 2006; Baroiller et al., 2009). O processo culmina com a diferenciação das células germinativas primordiais (PGCs) em ovogônias. Processos similares e concomitantes ocorrem com os componentes somáticos nas gônadas indiferenciadas. Nas ovogônias (recém diferenciadas), mudanças estruturais internas, seguidas de intensa proliferação mitótica, levam à formação de ninhos destas células. Nestes ninhos, algumas oogônias se apresentam comprometidas com a foliculogênese, as quais originam os ovócitos que iniciam a meiose avançado na prófase I até a fase de diplóteno (Grier, 2000). Neste estágio, cada ovócito (diplóteno) é envolvido por uma camada única de células somáticas (pré-foliculares) oriundas do epitélio germinativo que secretam uma lâmina basal e constituem o epitélio folicular. Sobre a lâmina basal recém-sintetizada, células pré-tecais dispõem-se ao seu redor e dão origem o teca interna e externa. Assim, o ovócito, o epitélio folicular, a lâmina basal e a teca formam um folículo ovariano (Selman et al., 1993; Grier, 2000).

O período inicial de desenvolvimento ovocitário é denominado de “crescimento primário”. Este processo parece ser independente das GtHs (Billard, 1992) e se caracteriza por aumento do volume do ovócito e intensa síntese de RNA e proteínas (Guraya, 1986; Lubzens et al., 2010) que serão responsáveis por parte da produção do vitelo nas fases subsequentes e pelo desenvolvimento completo do ovócito (Luckenbach et al., 2008; Lubzens et al., 2010). No início da fase de crescimento primário os ovócitos têm tamanho reduzido, citoplasma escasso, núcleo grande (basófilo) e nucléolo proeminente (fortemente basófilo) e são denominados como “cromatina-nucléolo” (Guraya, 1986). A fase de crescimento primário parece ocorrer independentemente de estimulação direta do Fsh e Lh (Billard, 1992) e demarca o desenvolvimento do ovócito até antes do início da fase vitelogênica (ou crescimento secundário).

Um dos eventos que marca o início do crescimento secundário do ovócito é o surgimento de estruturas conhecidas como “alvéolos corticais”, que se localizam frequentemente na região periférica do ovócito (Selman et al., 1993). Os alvéolos corticais são vesículas de dimensões variadas, que podem ser marcadas em reações histoquímicas que revelam a presença de carboidratos e proteínas (Mandich et al., 2002; Lubzens et al., 2010). Os alvéolos corticais surgem

próximos à membrana plasmática do ovócito e aumentam gradativamente em número e tamanho concomitantemente ao crescimento do ovócito, preenchendo o ooplasma (Lubzens et al., 2010). O desenvolvimento e a transição da fase de crescimento primário para secundário estão aparentemente associados ao Fsh, uma vez que durante este período foi encontrado um aumento nos níveis deste hormônio (Santos et al., 2001; Swanson et al., 2003) e seus receptores (Luckenbach et al., 2008).

O surgimento dos alvéolos corticais parece estar associado à uma elevação nas concentrações plasmáticas e hipofisárias de FSH e à uma elevação nos níveis plasmáticos de E_2 (Campbell et al., 2006). Além disso, andrógenos (como o 11-KT) (Rohr et al., 2001), o fator de transformação do crescimento beta ($Tgf\beta$) e proteínas envolvidas no sequestro de lipídeos também podem estar envolvidos neste processo (Luckenbach et al., 2008). Nesta etapa, se encontram proteínas envolvidas no sequestro de lipídeos indica que está próximo o início do processo de vitelogênese, que é marcado pelo surpreendente crescimento do ovócito devido à incorporação de vitelogenina (Vtg) que são clivadas em vitelo (Patiño et al., 2002).

A vitelogênese é uma fase bastante importante para a geração de ovócitos de qualidade, pois envolve o período de acúmulo de nutrientes que serão utilizados durante o desenvolvimento do embrião (Kayaba et al., 2001). Durante a vitelogênese dos teleósteos, o FSH secretado pela hipófise atinge a corrente sanguínea chegando até as células da granulosa, que são então estimuladas a secretar o E_2 . Este, via corrente sanguínea, atinge e estimula as células hepáticas a produzirem e secretarem as Vtgs, que chegam aos ovócitos via circulação sanguínea e são incorporados (Matsubara & Sawano, 1995; Nagahama & Yamashita, 2008). As Vtgs são fosfolipoglicoproteínas de alto peso molecular que quando absorvidas pelos ovócitos, via receptores, são clivadas proteoliticamente em proteínas menores para a formação do vitelo (Sire et al., 1994; Jalabert, 2005).

Após a conclusão da vitelogênese ocorre uma redução na atividade ovariana e os ovários são classificados como em “período de dormência”. A duração deste período é espécie-específica e também pode depender das condições de cultivo (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007). Em ambiente de cultivo, estes ovócitos vitelogênicos completos entram em processo de atresia

folicular, caracterizando o final da estação de desova (Leonardo et al., 2006; Krysko et al., 2008). Durante o processo de atresia e reabsorção dos folículos ovarianos em teleósteos ocorrem alterações marcantes na morfologia do ovócito e das células foliculares (Lubzens et al., 2010), como a desintegração do núcleo e organelas. Nesta etapa, os ovócitos começam a apresentar redução em seu diâmetro e irregularidades no formato (p. ex. invaginações) (Leonardo et al., 2006).

1.6. Estrutura testicular e espermatogênese em teleósteos

Os testículos dos teleósteos possuem estrutura organizacional básica semelhante a dos vertebrados (Schulz et al., 2010) e apresentam as funções endócrina e gametogênica (Pudney, 1995). Os testículos são compostos por dois compartimentos, o intersticial e o germinativo (Koulish et al., 2002). O primeiro é formado pelas células de Leydig (esteroidogênicas), tecido conjuntivo e vasos sanguíneos; o segundo pelas células germinativas (espermatogônias, espermátocitos, espermátides e espermatozoides), células peritubulares mióides, e células de Sertoli (Grier, 1981; Grier & Taylor, 1998; Parenti & Grier, 2004; Almeida et al., 2008; Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010).

De maneira geral, o compartimento germinativo dos testículos dos teleósteos pode ser classificado em “tubular anastomosado” ou “lobular” (Parenti & Grier, 2004). O “tubular anastomosado” é caracterizado por apresentar túbulos ramificados que se interconectam e se anastomosam desde a região testicular periférica até o ducto testicular principal. O “lobular” é caracterizado por apresentar estruturas digitiformes, que partem do ducto principal e terminam em fundo cego na periferia do testículo, formando um lóbulo.

Em ambos os tipos de compartimentos germinativos, as espermatogônias podem estar distribuídas ao longo de toda a extensão ou estarem próximas à porção distal, próximas à túnica albugínea. No primeiro caso, os testículos são classificados como “espermatogonial irrestrito”, no segundo como “espermatogonial restrito”. Deve se destacar que o tipo espermatogonial restrito que só foi observado em teleósteos pertencentes ao grupo atherinomorpha (Grier, 1981, 1993). Desta forma, os testículos dos teleósteos da ordem dos

Characiformes (que inclui o pacu) são normalmente do tipo: “tubular anastomosado irrestrito” (Grier, 1993).

Apesar dos distintos padrões morfológicos testiculares citados, a espermatogênese é um processo altamente conservado, complexo e coordenado que transforma uma célula germinativa diploide em gametas haploides (Leal et al., 2009; Nóbrega et al., 2009; Schulz, et al., 2005, 2010). Nos teleósteos e anuros este processo ocorre no interior de estruturas denominadas espermatocistos, formados por projeções (prolongamentos) de células de Sertoli que circundam as células germinativas (Pudney, 1993; 1995; Schulz et al., 2010). Interconectadas por junções oclusivas, adesivas e comunicantes, as células de Sertoli formam uma barreira física e funcional que atua sobre o desenvolvimento em grupo sincrônico das espermatogônias (Batlouni et al., 2005, 2009).

O desenvolvimento da espermatogênese em peixes pode ser dividido em três fases: proliferativa ou espermatogonial; meiótica ou espermatocitária; e de diferenciação ou espermiogênese (Schulz & Miura, 2002; Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010). De forma resumida, durante a fase espermatogonial as espermatogônias tipo A “indiferenciadas” proliferam por mitose e se localizam preferencialmente próximas a túnica albugínea e interstício. Dentre estas espermatogônias, algumas se diferenciam em espermatogônias tipo A “diferenciadas” que, por sua vez, passam por novas divisões, dando origem as espermatogônias secundárias ou do tipo B. Estas, depois de um determinado número (espécie-específica) de divisões mitóticas, diferenciam-se em espermatócitos primários, os quais iniciam a fase meiótica ou espermatocitária (Schulz & Miura, 2002; Schulz et al., 2005; Lacerda et al., 2006, 2012; Nóbrega et al., 2010).

Na fase espermatocitária, espermatócitos primários duplicam o seu material genético durante a fase S da interfase e iniciam a prófase meiótica apresentando uma quantidade $2N$ de cromossomos e $4c$ de DNA. Durante a prófase da primeira divisão meiótica, distintas subfases (pré-leptóteno, leptóteno/zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese) são descritas de acordo com o processo de condensação de DNA e pareamento dos cromossomos homólogos (Pudney, 1995). Ao final da prófase I ocorrem as fases de metáfase, anáfase e telófase e cada espermatócito primário gera dois espermatócitos secundários com quantidade N de cromossomos, porém estas ainda apresentam quantidade $2c$ de

DNA. Além de mudanças nucleares, mudanças citoplasmáticas como redução no volume e redução de organelas também são frequentemente observadas (Grier, 1993; Schulz et al., 2005; Leal et al., 2009). Os espermátocitos secundários iniciam a segunda divisão meiótica que é mais rápida que a primeira e não envolve pareamento de cromossomos homólogos. Estas células passam pelas fases de prófase II, metáfase II, anáfase II e telófase II e, após a separação das cromátides irmãs, formam células que contêm quantidade N de cromossomos e c de DNA (portanto haploides) e são chamadas de espermátides. Uma particularidade das divisões meióticas I e II é que as telófases I e II apresentam citocinese incompleta e as células resultantes permanecem unidas por pontes intercelulares (Schulz et al., 2010), o que contribui para que estas células formem um sincício e se desenvolvam de forma sincronizada até a formação dos espermatozoides. As junções celulares também têm papel importante neste processo (Batlouni et al., 2005, 2009).

As espermátides recém formadas passam por um processo denominado de espermiogênese, que envolve transformações no citoplasma e núcleo que culminam na formação dos espermatozoides (Schulz et al., 2010). O processo é bastante complexo e varia muito entre teleósteos (uma vez que diversos tipos morfológicos distintos são encontrados), até mesmo dentro de uma mesma ordem, como no caso dos Osteoglossiformes (Burns et al., 2009). De forma sumarizada, a diferenciação das espermátides em espermatozoides envolve eventos sequenciais, tais como: condensação gradativa da cromatina e compactação do núcleo, formação de um complexo centriolar (onde o centríolo proximal ancora a estrutura próximo a base do núcleo e o centríolo distal origina o flagelo), formação de uma fossa nuclear (que é uma depressão no núcleo onde se aloja o complexo centriolar), rotação do núcleo (que ocorre em algumas espécies e tipos de espermatozoides) e formação de um canal citoplasmático (que é um deslocamento da porção do citoplasma em direção ao núcleo, no local onde se forma a fossa nuclear) (Pudney, 1995). Ao término do processo, os espermatozoides dos teleósteos apresentam diversos tamanhos e formas. Mas, normalmente, encontra-se uma cabeça com formato arredondado ou alongado (em geral, a cabeça do espermatozoide é desprovida de acrossomo); o citoplasma e núcleo são reduzidos quando comparados com as espermátides; o flagelo desenvolvido normalmente é formado por um axonema do tipo 9 +2 e pode

apresentar-se duplicado e /ou envolvido por projeções laterais de citoplasma que formam abas; a pequena porção de citoplasma, localizada na porção onde se insere o flagelo, abriga normalmente um pequeno número de mitocôndrias (que varia de acordo com as espécies). Ao final da espermiogênese, podemos destacar também o rompimento das pontes intracelulares (Romagosa & Narahara, 2001; Batlouni et al., 2005). Após o rompimento dos cistos, os espermatozoides são liberados para o lúmen dos túbulos ou lóbulos e permanecem aí estocados. Em alguns casos, estes são estocados em ductos eferentes, ductos principais e/ou em vesículas seminais (Romagosa et al., 1993; Schulz & Miura, 2002).

1.7. Qualidade do sêmen e sua avaliação

De forma genérica, as disfunções no processo de espermição de teleósteos mantidos em ambiente de cultivo são de menor gravidade em comparação com àquelas do processo de ovulação, mas ainda assim necessitam de atenção especial (Mylonas & Zohar, 2001; 2007; Mylonas et al., 2010). Dentre as disfunções, podemos listar a liberação de sêmen em quantidade insuficiente (Suquet et al., 1992; Clear-water & Crim, 1998), a ausência completa de espermição (Berlinsky et al., 1997), a viscosidade do sêmen (que quando muito viscoso pode não dispersar em água ou diluentes) (Mylonas et al., 1998b) e outros. Contudo, a maioria dos tratamentos hormonais, tais como o uso de GtHs exógenas e GnRHa em conjunto ou não com a domperidona, têm propiciado resultados satisfatórios na indução à espermição (Mylonas & Zohar, 2001; Alavi et al., 2008).

Diversos fatores podem afetar a qualidade do sêmen dos teleósteos, tais como: estresse, nutrição, fotoperíodo, salinidade, temperatura, material genético e até mesmo diversos aspectos da indução hormonal (revisto por Bobe & Labbé, 2010). Neste contexto, durante a estação reprodutiva podem ocorrer variações em diversos parâmetros do sêmen que terminam por interferir na qualidade do mesmo. Estas oscilações já foram detectadas em diversos teleósteos marinhos e de água doce (Wang & Crim, 1997; Mylonas et al., 2003; Babiak et al., 2006; Cabrita et al., 2006; Sahinöz et al., 2007; Büyükhaticoglu & Holtz, 1984; Kruger

et al., 1984; Koldras et al., 1996; Luz et al., 2001; Alavi & Cosson, 2006) e até mesmo em peixes hormonalmente revertidos em machos (Nynca et al., 2012).

A avaliação da qualidade do sêmen e espermatozoides é um processo difícil de ser realizado (Kjorsvik *et al.*, 1990) e as principais variáveis consideradas, são: o volume, a concentração de espermatozoides, a osmolaridade, o pH, os íons do plasma seminal, a motilidade (número de células móveis) e a morfologia (Rurangwa et al., 2004). Dentre estes, a motilidade e o tempo de motilidade são considerados os principais parâmetros, pois podem estar diretamente relacionados com a capacidade de fertilização (Alavi & Cosson, 2005). Cabe ressaltar, que, além de se conhecer as características seminais, a morfologia dos espermatozoides também se faz importante para o estudo básico da biologia reprodutiva e para a produção de qualquer espécie íctica (Lahnsteiner, 2000).

Outra forma de avaliar a qualidade do espermatozoide é o teste de viabilidade, onde o porcentual de espermatozoides vivos e mortos é estimado baseado na integridade da sua membrana celular. O princípio desta técnica é que espermatozoides mortos perdem a funcionalidade de sua membrana celular (barreira seletiva) e se tornam permeáveis aos corantes eosina e nigrosina (Swanson & Bearden, 1951). Ademais, em animais aquáticos, danos ao DNA têm sido associados com diminuição do crescimento, desenvolvimento anormal e sobrevivência reduzida de embriões, larvas e adultos (Lee & Steinert, 2003). Estudos recentes têm mostrado que a baixa qualidade de desova (baixa taxa de fecundação) em reprodutores de *Solea senegalensis* pode estar relacionada à má (e altamente variável) qualidade do sêmen (Cabrita et al., 2006; Beirão et al., 2008; Martinez-Pastor et al., 2008).

O ensaio cometa é o método mais comumente utilizado para se avaliar a integridade do DNA em teleósteos (Bobe & Labbé, 2010). Este método baseia-se na capacidade e velocidade com que o DNA migra pelos poros do gel de agarose durante a eletroforese. É sabido que; durante a eletroforese, as moléculas (no caso o DNA) com diferente peso molecular apresentam diferente velocidade e capacidade de migração pelo gel de agarose. Desta forma, esta técnica detecta quebras de filamentos de DNA e sítios álcali-lábeis através da mensuração fornecem o padrão de migração do DNA a partir do DNA nuclear imobilizado (revisão em Lee & Steinert, 2003). Esta detecção pode ser realizada por análises

de imagem, que fornecem informações sobre a extensão de rupturas dos filamentos da molécula de DNA (Perez-Cerezales et al., 2009), partindo se do princípio de que uma célula com maior dano em seu DNA (fragmentação) terá um perfil de migração mais heterogêneo, formando uma figura que se assemelha a um cometa. Portanto, quanto mais danificado o DNA, maior será a cauda do cometa, enquanto núcleos com DNA intacto mostram um formato redondo homogêneo (Labbe et al., 2001).

Danos no DNA e conseqüentemente redução no sucesso da reprodução foram correlacionadas com concentrações crescentes de espécies reativas de oxigênio (EROs) em espermatozoides de carpa (*Cyprinus carpio*; Zhou et al., 2006). Também é estabelecido que o processo de respiração celular gera EROs (Kowaltowski et al., 2009). Desta forma, é provável que quanto mais tempo os espermatozoides permaneçam estocados nos testículos, maior é a concentração de EROs e consecutivamente os efeitos (p. ex. danos no DNA) de suas ações.

Em teleósteos, os espermatozoides podem permanecer estocados por longos períodos, uma vez que os mesmos começam a ser produzidos meses antes do período reprodutivo (Grier e Taylor, 1998; Brown-Peterson et al., 2002; Batlouni et al., 2006). Neste contexto, a reespermiação (espermiar um macho mais de uma vez por período reprodutivo) pode ser uma interessante alternativa para eliminar espermatozoides “velhos” e propiciar a coleta de espermatozoides “novos” (teoricamente de melhor qualidade) algumas semanas após a primeira espermição. Este processo já teve sua aplicabilidade demonstrada em trutas (Hajirezaee et al., 2009; Heyrati et al., 2010), de modo que a reespermiação pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos danosos dos longos períodos de estocagem de espermatozoides. Ainda neste contexto, em espécies reofílicas como o pacu, machos em maturação inicial, média ou tardia (e até mesmo em regressão) são capazes de fornecer sêmen (Nóbrega et al., 2009). Portanto a reespermiação, nestes casos, pode ser utilizada como ferramenta para evitar o uso de sêmen de qualidade heterogênea e de má qualidade.

2. JUSTIFICATIVAS

Apesar de ser uma das espécies de maior importância comercial para a aquicultura no país, na última década o pacu tem apresentado resultados insatisfatórios no que se refere à sua reprodução em ambiente de cultivo. Esta espécie já tem, por si só, a característica marcante de exigir habilidade e experiência do produtor na escolha de reprodutores realmente aptos à indução hormonal. Além disso, trata-se de umas das espécies mais exigentes com relação ao manejo correto dos reprodutores em fatores como a qualidade da água, o arraçoamento, a densidade de estocagem e o manejo adequado dos viveiros.

Neste sentido, aliada às exigências naturais da espécie, a falta de sincronia no processo de maturação ovariana das matrizes de um mesmo lote tem ocasionado dificuldades ainda maiores na reprodução e produção de alevinos desta espécie. A assincronia do plantel torna mais difícil a escolha certa das matrizes “aptas” para a indução hormonal, além de exigir do produtor a manutenção de um número grande de exemplares e manejo excessivo. Estes fatores podem acarretar enormes prejuízos financeiros, reduzindo o número de alevinos produzidos por fêmea (já que muitas vezes, muitas não desovam), exigindo gastos excessivos com mão de obra, provocando desperdício de hormônios e perda de matrizes (que frequentemente morrem quando não desovam). Desta forma, a presente proposta traz uma alternativa para melhorar o quadro atual da reprodução induzida desta espécie, propondo a utilização de um protocolo de estimulação da maturação ovariana de matrizes através do uso de implantes de sGnRHa.

De forma complementar a estudos sobre a formação de gametas de qualidade em fêmeas, se faz necessário o conhecimento da qualidade do sêmen e a busca por estratégias para obtê-lo, como forma de garantir a produção de ovos, larvas e alevinos de qualidade. Além disso, estudos nesta vertente podem ser potencialmente úteis para subsidiar estudos de protocolos de fertilização e auxiliar no desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao melhoramento animal, bem como em propostas de aplicação de biotecnologia de sêmen, tais como o resfriamento e a criopreservação.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de induzir o processo sincronizado de maturação ovariana num plantel de matrizes de pacu por meio de uso de implantes de liberação lenta de sGnRHa. Além disso, avaliamos as variações nas características da qualidade do sêmen e dos espermatozoides dos reprodutores de pacu ao longo do ciclo reprodutivo, bem como a possibilidade de reespermiação. A expressão gênica de *gh* e gonadotrofinas, bem como as concentrações plasmáticas de esteroides gonadais foram determinadas em distintos períodos ao longo do período experimental e entre grupos experimentais como ferramentas auxiliares para a interpretação dos resultados obtidos.

3.1 *Objetivos específicos:*

- Comparar fêmeas do grupo das tratadas e o grupo de animais controle no dia “0”, 21, 35 e 115 dias após a introdução dos implantes, os aspectos externos indicativos do grau de maturação, tais como: dilatação abdominal, rigidez ou maciez abdominal e grau de coloração da papila urogenital.
- Avaliar o estágio de desenvolvimento gonadal dos reprodutores por meio do índice gônado-somático, características macroscópicas e histológicas das gônadas.
- Determinar as concentrações plasmáticas dos esteroides gonadais (11-KT, T, E₂ e 17 α -OHP (17 α -hidroxiprogesterona)) dos reprodutores, sendo que nos machos foi determinado antes e após a indução hormonal.
- Avaliar as hipófises dos reprodutores para determinação dos níveis de expressão gênica de *gh*, *fshb* e *lhb*.
- Determinar as características seminais, tais como: o volume espermiado, íons e proteína total do plasma seminal, osmolaridade, densidade espermática, motilidade espermática, tempo de motilidade, índices de sobrevivência, e alterações morfológicas dos espermatozoides e avaliação da qualidade do DNA.
- Testar a possibilidade de reespermiação dos animais após 35 dias da primeira espermição, e determinar as suas características seminais.

MANUSCRITO I

**Uso de implantes com hormônio liberador de
gonadotrofina para maturação ovariana em pacu
(*Piaractus mesopotamicus*)**

artigo a ser submetido à revista "Aquaculture"

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de implantes de análogo do hormônio liberador de gonadotrofina do salmão (sGnRHa) para induzir o processo de maturação ovariana em fêmeas de pacu, *P. mesopotamicus*. Para isto, durante o período de vitelogênese (no dia 25/10/2010), 9 fêmeas receberam um implante de 150µg de sGnRHa e 9 fêmeas foram mantidas como controle. As fêmeas foram avaliadas comparativamente 21, 35 e 115 dias após a introdução dos implantes (dci) quanto ao desenvolvimento ovariano, por meio de análises macroscópicas, histológicas, concentração de esteroides gonadais (17α-hidroxiprogesterona (17α-OHP), 17β-estradiol (E₂), testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT)) e expressão gênica do *subunidade beta do hormônio folículo estimulante (fshb)*, *subunidade beta do hormônio luteinizante (lhb)* e do *hormônio do crescimento (gh)*. Observamos as principais diferenças entre os grupos aos 35 dci (durante o período de desova), quando o percentual de fêmeas tratadas (77,5%) com abdômen pouco macio ou macio foi superior ao dos controles (50%) e o percentual de fêmeas tratadas (60%) em maturação avançada (por classificação histológica) foi superior ao dos controles (20%). No mesmo período (35 dci), a expressão relativa dos genes *lhb* e *fshb* estava respectivamente aumentada e reduzida nas fêmeas tratadas e controles, porém, não houve diferenças em relação ao *gh* e nas concentrações dos esteroides analisados. Assim, pela análise conjunta dos dados, observamos que o uso de implantes de sGnRHa pode elevar, em até 40%, o percentual de fêmeas de pacu aptas à indução hormonal na época de desova. Os resultados inéditos obtidos abrem um grande leque de oportunidades para uso desta técnica para propiciar maior previsibilidade na época de desova e incrementar, sob diversos aspectos, o desempenho reprodutivo de peixes reofílicos sul-americanos de desova total.

Palavras-chave: pacu, sincronização, maturação ovariana, sGnRHa, implante.

Abstract

The aim of this research was to evaluate the effect of salmon gonadotropin releasing hormone analog (sGnRHa) implants seeking to promote synchronization of ovarian maturation in pacu, *P. mesopotamicus*. For this purpose, during the vitelogenesis period (10/25/2010), 9 pacu female received 150 μ g of sGnRHa implants and another 9 females were taken as control. The ovarian maturation was evaluated by macroscopic and histological analysis, also, plasma gonadal steroids concentration and pituitary *follicle-stimulating hormone beta subunit (fshb)*, *luteinizing hormone beta subunit (lhb)* and *growth hormone (gh)* gene expression were comparatively evaluated at 21, 35 and 115 days after introduction of implants (dci). We noted the major differences between the groups at 35 dci, during spawning season, the frequency of treated females with little softy or softy belly (77.5%) was higher than control's (50%). This observation was supported by histological analysis that revealed a superior percentage of females in late maturation in the treated (60%) than control group (20%). Furthermore, in the same period (35 dci), the expressions of *lhb* and *fshb* genes were respectively up and down regulated in the treated females compared to controls, but, no significant differences to *gh* and in steroid hormones analyzed were found. Thus, we observe by combining analysis of the data that the use of sGnRHa implants increased, in 40%, the percentage of pacu female suitable for hormonal induction in the spawning season. The unpublished results achieved opens up a broad range of opportunities for the using of this technique to provide more predictability in the spawning season and increasing in several respects, the reproductive performance of total spawner South American rheophilic fish.

Key words: pacu, synchronization, ovarian maturation, sGnRHa, implants.

1. Introdução

O pacu é uma espécie reofílica (migradora) com grande importância na aquicultura, que apresenta ciclo reprodutivo sazonal e desova total (revisto em Zaniboni-Filho e Weingart, 2007). A desova ocorre nos meses de novembro a janeiro e o processo de maturação das gônadas se torna mais evidente entre os meses de setembro e outubro, atingindo estádios mais avançados de maturação entre os meses de outubro e janeiro (Lima et al., 1991; Romagosa et al., 1993)

Em condições de cultivo, a desova dos peixes reofílicos sul-americanos só pode ser obtida mediante indução hormonal (Zaniboni-Filho e Weingart, 2007). No caso do pacu, já foram realizados com o uso de diversos tipos de hormônios, tais como: o hCG (gonadotrofina coriônica humana) (Romagosa et al., 1990), GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) (antigo “LHRH”) (Carolsfeld et al., 1988) e extrato bruto de hipófise de carpa (EHC) (Bock e Padovani, 2000; Godinho e Godinho, 1986). No entanto, apesar da técnica de indução hormonal estar sendo usada ao longo de décadas, irregularidades e deficiências ainda são muito frequentes no processo de produção de alevinos de teleósteos reofílicos sul-americanos (Criscuolo-Urbini et al., 2012; Hainfellner et al., 2012a, 2012b). Neste contexto, devemos ressaltar que o pacu apresenta um elevado grau de assincronia no processo de maturação ovariana entre as fêmeas de um mesmo lote. A frequência de fêmeas com abdômen duro e sem papila hemorrágica (consideradas imaturas) é muito frequente nas triagens para seleção de fêmeas aptas para indução hormonal no momento da desova. Além disso, falhas na ovulação ocorrem mesmo em fêmeas consideradas “aptas” (ventre abaulado e com papila hemorrágica), mas as razões para tal têm sido praticamente inexploradas. Investigações recentes revelaram que estas falhas podem estar centradas no processo de ovulação, uma vez que a fase anterior a esta, que envolve a migração e quebra da vesícula germinativa (do termo em inglês “*germinal vesicle breakdown – GVBD*”), ocorre normalmente mesmo em fêmeas que não ovulam (Criscuolo-Urbini et al., 2012).

Dentre inúmeras outras causas para as irregularidades mencionadas, numa primeira análise, a existência de assincronia no estágio de maturação das fêmeas provoca um manejo excessivo até que peixes “aptos” sejam encontrados.

É sabido que o estresse de manejo pode induzir apoptose (atresia) dos oócitos nas fêmeas, reduzindo a qualidade dos gametas e/ou mesmo inibindo a reprodução (Bobe e Labbé, 2010; Brooks et al., 1997; Campbell et al., 1992, 1994; Schreck, 2010). Além disso, independentemente de um possível stress de manejo, fêmeas consideradas aptas, apresentando abdômen macio e abaulado e papila hemorrágica, muitas vezes não ovulam quando submetidas à tratamentos hormonais convencionais (Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012). Assim, o controle da maturação ovariana e a possibilidade de sincronização deste processo é uma ferramenta importante para evitar o manejo excessivo e incrementar a reprodução induzida de fêmeas de um mesmo lote e pode ser obtida por meio do uso implantes de GnRH (Carral et al., 2003; Gardes et al., 2000).

O uso de implantes de liberação lenta de GnRH vem sendo estudado e avaliado em diversas espécies de teleósteos (Marino et al., 2003; Mylonas et al., 1992, 1998, 2003), como por exemplo em espécies marinhas de difícil manejo como o atum, *Thunnus thynnus*, (Mylonas et al., 2007). Além disso, alguns produtos comerciais, já testados em salmonídeos, como por exemplo, o Ovaplant® (Syndel, Qualicum Beach, BC, CA), permitem prever, antecipar e incrementar a desova. Neste contexto, o uso de Implantes de GnRHa promoveu a antecipação do período de desova em torno de 2 meses do “milkfish”, *Chanos chanos*, (Lee et al., 1986) e quando combinado à domperidona (antagonista de dopamina) intensificou o processo vitelogênico do curimã, *Mugil cephalus* (Aizen et al., 2005).

Os efeitos do implante de GnRH sobre a maturação ovariana dos teleósteos são precedidos por alterações em diversos níveis do eixo hipotálamo - hipófise - gônadas. Assim, implantes de GnRHa, aplicados em “winter flounder”, *Pseudopleuronectes americanus*, no início da vitelogênese, induziram a elevação das concentrações de testosterona (T) e estradiol (E₂) com o concomitante aumento do diâmetro do oócitos e do índice gonadosomático (IGS) (Harmin et al., 1995). A aplicação de implantes de liberação lenta de GnRHa pode induzir elevações de mRNA do gene do *receptor de GnRH*, *fshb* e *lhb* na hipófise, assim como dos níveis plasmáticos de Lh, e hormônios esteroides (Mylonas e Zohar, 2007). Além disso, o GnRH também atua sobre a síntese e liberação do hormônio do crescimento (Gh), que pode ser considerado como uma “co-gonadotrofina” em teleósteos, participando sobre o eixo gonadotrófico, contribuindo na

gametogênese e esteroidogênese (Chang e Wong, 2009). Podendo o Gh também atuar, juntamente com o E₂, na indução da síntese da vitelogenina (Vtg) no fígado (Mosconi et al., 2002).

A possibilidade de antever, e com precisão, o momento da desova facilita e permite que os produtores tenham capacidade de se organizar melhor, mas principalmente elaborar com maior antecedência e segurança as próximas fases no processo de produção de alevinos, que são larvicultura e alevinagem. Muitas vezes, os viveiros são preparados e adubados, porém as matrizes não estão aptas ou não respondem satisfatoriamente aos tratamentos hormonais. Assim, neste estudo avaliamos o uso de pellets de liberação lenta de sGnRHa para induzir o processo de maturação ovariana do pacu. Nosso objetivo foi conhecer, de forma pioneira em teleósteos migradores sul americana de desova total, o efeito do uso deste tipo de tratamento e avaliar se o mesmo pode promover a indução do processo de maturação ovariana em um plantel de fêmeas.

2. Material e Métodos

2.1. Manutenção, implantes de sGnRHa e coletas

Fêmeas microchipadas (AnimalTAG® - Korth RFID Ltda, São Carlos, SP) de aproximadamente 4 anos de idade foram mantidas em viveiros escavados de 200m³ em uma densidade de 0,25 peixe·m⁻³ no Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP (Jaboticabal, SP). As fêmeas foram obtidas por meio de desova induzida. O viveiro foi abastecido com uma vazão constante de água (\cong 20 L/min). Análises físicas e químicas da água foram realizadas quinzenalmente (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, condutividade, e amônia total). As concentrações de oxigênio, condutividade e temperatura foram determinadas com um oxímetro YSI modelo 55 YSI e com uma sonda multiparâmetros modelo 63 (Yellow Spring Instruments, Yellow Springs, OH, USA). A concentração de N-Ammonia foi determinada de acordo com o método de Solórzano (1969). Os peixes foram arraçoados com ração comercial (Guabi, Campinas, SP, BR – composto por 32,0% proteína bruta, 6,5% extrato etéreo, 10,0% cinzas e 7,0% matéria fibrosa) 2

vezes ao dia *ad libitum*. Os animais foram utilizados (e quando necessário eutanasiados) de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp (Jaboticabal, SP, BR).

No dia 25/10/2010 – (“dia 0”), para compor o grupo tratado, 9 fêmeas aleatoriamente capturadas foram injetadas com um implante de sGnRHa (análogo do hormônio liberador de gonadotrofina do salmão/ Ovaplant® - Syndel, Qualicum Beach, BC, CA), na dosagem de 150 g, com aplicador RALGUN® (Syndel, Qualicum Beach, BC, CA). Outras 9 fêmeas receberam apenas uma injeção de solução salina no mesmo local de injeção do tratamento para compor o grupo controle.

No “dia 0” (n=9 por grupo), 21 dias com o implante (dci), (n=4 por grupo), 35 dci (n=7 por grupo) e 115 dci (n=3 por grupo) os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), pesados (kg) (massa total – W_T) e fotografados. O número amostral variou entre coletas, pois determinamos que a rede de despesca seria passada no máximo 2 vezes nos viveiros e o número amostral seria o que fosse obtido com este esforço. Esta medida foi tomada para que o esforço para a captura dos animais fosse igual entre as amostras evitando que diferentes níveis de estresse pudessem interferir nos resultados. De cada imagem digitalizada foram tomadas as seguintes medidas métricas (cm): Comprimento padrão (L_S) - comprimento da margem anterior da cabeça até a margem posterior do corpo (inserção da nadadeira caudal) e largura do abdômen (W_A) - distância máxima do ventre transversal ao eixo do corpo. As medidas foram tomadas utilizando-se o software livre IMAGE J (E.U. National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), onde cada medida foi tomada em triplicata e a média das mesmas utilizada para as análises.

De posse destes dados também foi estimado o índice W_A/L_S – Largura do abdômen/comprimento padrão. Além disso, a consistência do abdômen e a coloração da papila foram avaliadas por meios visuais e táteis, sendo a consistência abdominal classificada como: dura (D), pouco macia (P) ou macia (M); já a papila como: não-hemorrágica (N), hemorrágica (H) ou extremamente hemorrágica (E).

Devido ao reduzido número amostral, comum a este tipo de estudos com matrizes, que demandam baixas densidades de estocagem e um grande número

de viveiros, estabeleceu apenas dois períodos de amostragem, aos 35 dci (n=5 por grupo) e 115 dci (n=3 por grupo), quando as fêmeas foram eutanasiadas (benzocaina – 20 g/L) para coleta de órgãos. O período de 35 dci foi estrategicamente definido, pois, em outras espécies, onde implantes similares foram utilizados, observou-se que os níveis de gonadotrofinas eram mantidos elevados por aproximadamente 4 semanas (Crim et al., 1988), período similar aos 35 dci por nós estabelecido. No caso dos 115 dci, este período foi determinado por ser o final da estação reprodutiva e por necessitarmos de um segundo ponto para comparação entre os grupos. O fígado, vísceras, gordura visceral e ovários foram pesados (g). De posse destes dados, os seguintes índices corpóreos foram calculados: hepatosomático, viscerosomático, gordura visceral e gonadosomático, todos calculados por $[(\text{massa do órgão (g)} \times \text{massa total (g)}^{-1}) \times 100]$. Na primeira (n=5 controles), segunda (n=4 por grupo), terceira (n=5 por grupo) e na quarta coleta (n= 3 por grupo) foram colhidas amostras de sangue (± 3 mL) utilizando seringas e agulhas descartáveis previamente lavadas com anticoagulante (EDTA), o número amostral variou devido ao número de vezes (2 vezes) que foram passadas a rede de despesca. O sangue foi transferido para micro tubos (2 mL) e centrifugado a 3.000 $\times g$ por 10 minutos. O plasma foi então separado e alíquotado em criotubos e posteriormente congelado e mantido à -70°C , até o momento de seu uso.

Nas duas últimas coletas, amostras de ovários (região anterior, média e posterior) foram fixadas por 24 horas em solução de glutaraldeído (2,5% de glutaraldeído, tampão fosfato 0,05M, pH 7,3) e posteriormente preservadas em tampão fosfato (0,05M, pH 7,2). Fragmentos de $\cong 1$ g dos ovários (região média) foram fixados em solução de Gilson modificado (100 mL 60% álcool, 800 mL água destilada, 15 mL 80% ácido nítrico, 18 mL ácido acético glacial, 20 g cloreto de mercúrio) para posterior cálculo das taxas de fecundidade absoluta. Também foram extraídas as hipófises que foram submergidas em solução estabilizadora de RNA (RNAlater® - Ambion® Inc., Austin, TX, USA), mantidas nesta solução por 24 horas em refrigerador a 4°C e posteriormente estocadas a -80°C .

2.2. *Taxas de fecundidade*

A fecundidade absoluta foi determinada pelo número de oócitos presente nos fragmentos submersos em solução de Gilson. Pelo número obtido, estimou-se o número total de oócitos por massa (g) de ovário.

2.3. *Classificação macro e microscópica do estágio de maturação ovariana*

As amostras fixadas em glutaraldeído 2,5% (conforme descrito anteriormente) foram incluídas em Histosec[®] (Merck, Darmstadt, DE). Cortes histológicos de 3 μ m foram obtidos e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Para determinação do estágio de maturação ovariana foi adotada uma análise semelhante à utilizada por Leonardo et al. (2006), que considera características macro (cor, formato, tamanho e aparência) e histológicas dos ovários. Para a determinação dos estádios, efetuamos também uma análise visual, onde estabelecemos, individualmente, baseando-se pela descrição feita por Lima et al. (1991), as frequências dos oócitos nas seguintes fases: pré-vitelogênicos (PV), alvéolo cortical (AC), vitelogênicos (V) e atrésicos (AT). Assim, as fêmeas foram classificadas como em: repouso, maturação inicial, maturação avançada e regressão.

2.4. *Hormônios esteroides*

As concentrações plasmáticas de 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP), 17 β -estradiol (E₂), testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) foram determinados por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando kits comerciais (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA para 11-KT e BioCheck, Inc., Foster City, CA, EUA para os demais) seguindo as instruções do fabricante. As placas de 17 α -OHP, E₂ e T foram lidas a 450 nm e as de 11-KT a 405 nm em um leitor de placas Spectramax 250 (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA). Todas as amostras foram lidas em duplicata, e para a validação dos kits foram realizados testes intra e inter-ensaio, com as respectivas variações: 0,00 a 11,30% e 0,11 a 8,56 para 17 α -OHP; 0,31 a 24,11% e 0,35 a 3,75% para E₂; 0,75 a 19,99% e 1,75 a 9,31% para T; 0,33 a 12,67 e 3,09 a

9,23% para 11-KT. Para as análises de hormônios esteroides foram excluídas as fêmeas em repouso, pois as mesmas poderiam influenciar nas concentrações plasmáticas dos hormônios, uma vez que, não responderam ao tratamento e aos fatores ambientais no caso do grupo controle.

2.5. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das hipófises foi extraído utilizando RiboPure™ (Ambion®, Austin, TX, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Tanto a quantificação de RNA total quanto a confirmação de presença de DNA foram realizadas por fluorímetro Qubit™ fluorometer (Invitrogen™), empregando-se os kits Quant-iT™ RNA Assay (Life Technologies™, Eugene, OR, USA) e Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay (Life Technologies™, Eugene, OR, USA). A calibração e quantificação foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Não foram observadas amostras contaminadas com DNA. Para avaliação da integridade dos RNAs foi utilizado o Agilent 2100 Bioanalyzer com o kit Agilent RNA 6000 Pico (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Amostras com RIN maiores que 8,5 foram aceitas.

Para a síntese do cDNA, os RNAs totais foram usados como *template* para síntese da *first-strand cDNA* com a SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Os cDNAs obtidos foram utilizados para clonagem dos genes. Para a PCR em tempo real (RT-qPCR) foi empregado o kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), que utiliza hexâmeros aleatórios (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA).

2.6. Clonagem parcial dos genes para o hormônio folículo estimulante beta (*fshb*), hormônio luteinizante beta (*lhb*) e fator de alongação 1-a (*ef1a*)

Para a clonagem parcial do gene do *lhb* de pacu, a primeira fita de cDNA foi utilizada como DNA molde para a reação de PCR com oligonucleotídeos degenerados desenhados por Parhar et al. (2003) para clonar o *lhb* da tilápia (*Oreochromis niloticus*). Para os genes *fshb* e *ef1a*, reações de PCR foram conduzidas com primers desenhados a partir de sequências de outras espécies

de peixes, no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) do National Center of Biotechnology Information (NCBI). O tamanho dos fragmentos esperados foram de 361, 220, e 660 bp para *fshb*, *lhb* e *ef1a*, respectivamente. Todos os oligonucleotídeos de iniciação (primers) estão listados na Tabela 1, a sequência gênica do *gh* (GenBank accession no. DQ206404.1) foi utilizado para desenhar os primers utilizados para expressão gênica, para os demais genes foram utilizados as sequências obtidas neste estudo.

O genes *ef1a* e *lhb* foram clonados utilizando-se o Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante em uma reação de 25 µL. As condições da reação de PCR consistiram em 2min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 1 min a 68°C e extensão final de 5 min a 68°C seguida de inclusão de 1U/por reação de Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 10 min a 72°C. Já para *fshb* foi empregado o *kit* Advantage 2 DNA polymerase kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) com as condições da reação de PCR de 15 s a 95°C, 35 ciclos de 10 s a 95°C, 15 s a 54°C, 40 s a 68°C e extensão final de 1 min a 68°C. Os produtos de PCR foram analisados quanto ao seu peso molecular em gel de agarose a 2%. Quando o tamanho esperado foi encontrado, os produtos foram purificados do gel e clonados em bactérias utilizando o vetor pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para *ef1a* e *lhb*, e o vetor pcDNA[™]3.1 V5-His TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para o *fshb*. Reações de PCR com os oligonucleotídeos utilizados para clonar os genes foram realizadas para confirmar a presença do inserto nos plasmídeos extraídos das bactérias transformadas pelos vetores, e então enviados para sequenciamento.

A acurácia e a qualidade das sequências de nucleotídeos, provenientes do sequenciamento, foram avaliadas manualmente com a ajuda do software Chromas Lite v2.1 (Technelysium Pty Ltd., Helensvale, QLD, AU - http://technelysium.com.au/?page_id=13). As sequências de aminoácidos previstas para cada gene foram alinhadas para avaliar a sua semelhança com as sequências de outras espécies utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) da NCBI (direto do website: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7. PCR quantitativo em tempo real

As amostras para a RT-qPCR foram analisadas em duplicata em uma placa óptica de 96 poços em um termociclador ABI PRISM® 7900HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) em configuração padrão. Os 20 µl totais de reação constituíram-se de 5 µL de cDNA; 900 nM de oligonucleotídeos de iniciação senso; 900 nM de oligonucleotídeos de iniciação anti-senso e 2× SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA – as sequências dos primers estão disponíveis na Tabela 1). As expressões dos genes alvos (*gh*, *fshb* e *lhb*) foram normalizadas pelo gene *ef1a* e calibrado pelo grupo controle. A eficiência das reações foi avaliada de acordo com a equação $Ct = m \times (\log Q) + c$, sendo o *Ct* o limiar do ciclo, *Q* número de cópias iniciais, *c* a intercepção sobre o eixo *Y* e *m* a inclinação (Bogerd et al., 2001). Diluição seriada de mistura de todas as amostras de cDNA foi realizada, sendo encontrada para todos os conjuntos de oligonucleotídeos uma curva padrão com o valor de inclinação de 2, indicando que as reações tiveram amplificações exponenciais, e que dois ciclos eram exigidos para ter um aumento de 4 vezes na quantidade de DNA inicial. Para o cálculo da expressão gênica foi utilizado o método de $\Delta\Delta Ct$, conforme descrito por Bogerd et al. (2001).

2.8. Análises estatísticas

Todos os testes estatísticos foram realizadas com o auxílio dos softwares STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) ou Excel (Microsoft, Redmond, USA). Os pressupostos como a normalidade e homocedasticidade foram testados pelos testes de Shapiro–Wilk's e Levene's, respectivamente. As variáveis paramétricas (dados biométricos, W_A/L_S , índices corpóreos e fecundidade) foram avaliadas por teste *t* de Student. Já para as variáveis não paramétricas e/ou em caso de não ser encontrado os pressupostos (concentrações hormonais e expressão gênica) foi utilizado o teste não paramétrico Mann–Whitney *U* teste. Todos os testes foram realizados com o nível de significância de $\alpha=0,05$, sendo expressados como média±EP.

3. Resultados

3.1. *Manutenção, morfometria, fecundidade e avaliação externa*

As variações, mínimas e máximas, de temperatura (22 a 30°C), pH (6,59 e 7,46), condutividade (41 a 122 μ S/cm) amônia total (0,00 a 0,50 ppm) e oxigênio dissolvido (4,26 a 7,46mg/L) na água dos viveiros apresentaram-se satisfatórias durante todo o período experimental, mantendo-se dentro do padrão recomendado para reprodutores de espécies nativas (Bock e Padovani, 2000; Murgas et al., 2009; 2012).

As médias dos dados biométricos estão apresentadas na Tabela 2, na qual se observa os valores foram semelhantes ($p>0,05$) para todas as variáveis analisadas nos dois grupos (W_A , L_S , massa corporal e W_A/L_S).

Com relação à consistência do abdômen, aos 21 dci, todas as fêmeas do grupo controle ($n=4$) foram classificadas como D e 3 fêmeas tratadas foram classificadas como D e uma como P (Fig. 1). No mesmo período, todas as fêmeas foram classificadas como N, em relação à papila (Fig. 1).

Aos 35 dci observamos que de um total de 7 fêmeas tratadas e 7 controles, 1 (14,3%) e 4 (57,1%), 5 (71,4%) e 3 (42,9%) e 1 (14,3%) e 0 (0,0%) apresentavam-se D, P e M, respectivamente. No mesmo período, com relação ao aspecto da papila urogenital, observamos para fêmeas tratadas e controle que 5 (71,4%) e 7 (100,0%), 1 (14,3%) e 0 (0,0%) e 1 (14,3%) e 0 (0,0%) apresentavam-se N, H e E, respectivamente. Aos 115 dci as fêmeas de ambos os grupos foram classificadas predominantemente como D e N, de um total de 3 fêmeas tratadas (100,0%) e 3 controles (66,6%) (Fig. 1).

Analisando individualmente as fêmeas, observamos entre o “dia 0” e 35 dci que 5 de 7 fêmeas tratadas passaram da classificação de D para P e 1 de P para M, enquanto que no grupo controle apenas 2 fêmeas, de 7 analisadas, tiveram a mesma evolução (de D para P) (Fig. 1). Com relação ao aspecto da papila, também entre “dia 0” e 35 dci, 2 tratadas e 0 controles, de 7 analisadas por grupo, passaram de N para H ou E (Fig. 1).

Os valores médios dos índices corpóreos, apresentados na Tabela 3, foram similares entre os grupos ($P>0,05$), exceto pelo do índice hepatossomático que foi superior no grupo das tratadas 35 e 115 dci ($P<0,05$). Os valores médios

observados para os dados de fecundidade absoluta também foram similares entre os grupos aos 35 e 115 dci (Tabela 3).

3.2. *Estágio de maturação ovariana*

As características dos estádios de maturação ovariana, definidas macro e microscopicamente, estão apresentadas na Fig. 2. Aos 35dci de um total de 5 fêmeas por grupo, 20% (n=1) e 60% (n=3), 60% (n=3) e 20% (n=1), 20% (n=1) e 20% (n=1) das fêmeas tratadas e controles apresentaram ovários em repouso, maturação avançada e regressão, respectivamente (Fig. 3). Já aos 115 dci do total de 3 fêmeas por grupo, 33% (n=1) e 33% (n=1), 33% (n=1) e 67% (n=2), 33% (n=1) e 0% (n=0) das fêmeas tratadas e controles apresentaram ovários em repouso, maturação avançada e regressão, respectivamente (Fig. 3).

3.3. *Hormônios esteroides*

Os valores das concentrações plasmáticas médias de E₂, T, 17 α -OHP e 11KT foram similares entre os grupos nas mesmas coletas (Fig. 4). Contudo, observamos entre 21 dci (início da fase de desova) e 115 dci (fase de regressão ovariana) uma tendência de redução gradativa nos níveis de E₂ e 11KT em ambos os grupos (Fig. 4). Com relação à 17 α -OHP e T observamos valores similares entre os grupos ao longo do período experimental (Fig. 4).

3.4. *Clonagem e Expressão gênica*

Fragmentos do cDNA de *fshb*, *lhb* e *ef1a* foram isolados por PCR de clonagem e sequenciados. As sequências foram pesquisadas e alinhadas por BLAST (Altschul et al., 1997) utilizando o banco de dados GenBank[®] (NCBI). A sequência prevista de aminoácidos para o fragmento de cDNA do gene para *fshb* (GenBank accession no. KC867349) de pacu com 361 pb teve 82, 79 e 74% de identidade com a sequência de aminoácidos do Fshb do *Clarias gariepinus* (GenBank accession no. AAN75753.1), *Silurus meridionalis* (GenBank accession no. AAY42270.1) e *Rutilus rutilus* (GenBank accession no. ACN79582.1), respectivamente. Para a sequência prevista de aminoácidos para o fragmento de cDNA do gene para *lhb* (GenBank accession no. KC867348) de pacu com 259 pb

foi encontrado 96% de semelhança com as sequências de aminoácidos do Lhb da *Schizothorax prenanti* (GenBank accession no. AEB33873.1), *Mylopharyngodon piceus* (GenBank accession no. AAK07414.1), *Ctenopharyngodon idella* (GenBank accession no. ABM73670.1), *Hypophthalmichthys nobilis* (GenBank accession no. ABQ42715.1) e *Pimephales promelas* (GenBank accession no. ABB51645.1).

Já para a sequência prevista de aminoácidos para o fragmento de cDNA do *ef1a* (GenBank accession no. KC867347) de pacu com 660 pb foi 100% semelhante a sequência de aminoácidos do *Ef1a* do *Lithodoras dorsalis* (GenBank accession no. AAQ62486.1), *Megalodoras uranoscopus* (GenBank accession no. AAQ62485.1), *Rhinodoras boehlkei* (GenBank accession no. AAQ62489.1), *Anadoras grypus* (GenBank accession no. AAQ62485.1), *Trachydoras microstomus* (GenBank accession no. AAQ62525.1) e *Orinocodoras eigenmanni* (GenBank accession no. AAQ62492.1).

As fêmeas em repouso também foram excluídas das análises de expressão gênica. Os valores médios da expressão relativa do *fshb* nas fêmeas tratadas 35 dci foram inferiores as controles ($p < 0,05$) e semelhante a todos os outros valores médios ($p > 0,05$) (Fig. 5). Por outro lado, na mesma coleta, o valor médio da expressão de *lhb* das fêmeas tratadas foi superior a todos os outros valores médios calculados ($p < 0,05$). Os valores médios da expressão gênica de *gh* foram similares em todos os períodos analisados ($p > 0,05$) (Fig. 5).

4. Discussão

Neste estudo, visando promover a sincronização da maturação ovariana de um plantel de pacu, utilizamos implantes de sGnRHa (150 µg). A compilação dos resultados sugere um efeito positivo dos implantes sobre o processo de maturação ovariana na espécie, aumentando a frequência de fêmeas aptas à indução hormonal (maduras) na época de desova.

No entanto, mesmo já tendo demonstrado resultados positivos e interessantes, no nosso conhecimento, se trata da primeira tentativa de indução a maturação ovariana em peixes sul-americanos tropicais de desova total utilizando implantes de liberação lenta de sGnRHa. Desta forma, novas investigações são necessárias para conhecer e dominar o uso desta técnica, como por exemplo:

comparar distintas concentrações hormonais, comparar distintos hormônios (outras formas de GnRH, E₂ e Fsh) e testar o uso de outros veículos, como a espuma vinílica acetinada (Barbaro et al., 2002; Breton et al., 1990; Chang et al., 1995; Mylonas et al., 1997a, 1995, 2007; Mylonas e Zohar, 2001).

O uso de implantes de liberação lenta de hormônios tem sido amplamente empregado em espécies de peixes de água doce (Mylonas et al., 1992, 1995) e marinhos (Mylonas et al., 1998; Fornies et al., 2001; Mañanós et al., 2002; Marino et al., 2003). A maior parte dos resultados foi obtida com espécies de peixes de desova parcelada que desovam naturalmente em ambiente artificial de cultivo. Nestas espécies, o uso de implantes pode incrementar o número de desova por fêmeas, bem como as respectivas taxas de fecundidade (Mylonas et al., 1998, 2003). Neste contexto, observamos neste estudo que os implantes de GnRH podem ser utilizados para uma finalidade um pouco diferente em peixes tropicais sul-americanos.

Nas espécies do hemisfério norte largamente explorado neste aspecto, os implantes intensificam as desovas, as quais já ocorrem nas fêmeas, pois são de desova parcelada e desovam naturalmente mesmo em condições de cultivo (Mylonas e Zohar, 2001, 2007; Mylonas et al., 2010). No caso do pacu, verificamos que o uso dos implantes pode promover o aumento na frequência de fêmeas aptas na época de desova, mas que ainda assim precisam ser submetidas à desova com protocolos tradicionais (duas doses de extrato bruto de hipófise com 12 horas de intervalo) para que a ovulação seja atingida, pois não desovam naturalmente. O padrão de respostas encontradas para o pacu (teleósteo de desova total) difere também daquele existente para outros teleósteos de desova total como os salmonídeos, que não necessariamente precisam ser induzidos hormonalmente para desovarem (Mylonas et al., 1992). No entanto, a intensificação de estudos com implantes de liberação lenta de GnRH pode futuramente substituir a necessidade de tratamentos hormonais específicos para a ovulação em teleósteos reofílicos sul-americanos, mudando os paradigmas da produção de alevinos destas espécies.

Observamos que os implantes de 150 µg de sGnRH_a necessitam ser introduzidos com ao menos 35 dias para se obter um aumento na frequência de fêmeas de pacu aptas à desova. Neste intervalo, houve aumento na frequência de fêmeas com abdômen macio e/ou pouco macio e ovários em maturação

avançada no grupo das tratadas em relação ao controle. Os valores de IHS também superiores nas fêmeas tratadas aos 35 e 115 dci podem estar associados com a intensificação do processo de maturação ovariana nas fêmeas tratadas. Santos e colaboradores (2004) reportaram que fêmeas de *Iheringichthys labrosus* em maturação inicial e avançada apresentavam valores de IHS superiores às fêmeas em repouso. De acordo com os autores, o aumento de IHS estaria associado com a síntese de Vtg no fígado, a qual é sabidamente precursora do vitelo dos ovócitos (Nagahama e Yamashita, 2008).

Aos 35 dci, o grupo controle apresentou uma maior expressão relativa de *fshb* em comparação ao grupo das tratadas, e de forma inversa, os níveis de expressão relativa de *lhb* foram expressivamente superiores nas fêmeas tratadas. O GnRH controla a secreção e liberação de Lh e Fsh (Trudeau et al., 1991; Trudeau, 1997, Millar, 2005; Kah et al., 2007), os quais provocam aumentos nas concentrações plasmáticas de $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) (indutor da maturação e ovulação em teleósteos) e E_2 (indutor da vitelogênese em teleósteos) (Nagahama e Yamashita, 2008). Observamos que os implantes de sGnRHa intensificaram a expressão gênica de *lhb* nas fêmeas tratadas, mas não de *fshb*, resultado que corrobora o descrito por Mateos e colaboradores (2002) que encontraram em *sea bass* (*Dicentrarchus labrax*), que o GnRHa estimulou a síntese e liberação de Lh na hipófise. De forma similar, em *sockeye salmon* (*Oncorhynchus nerka*), o uso de implantes de GnRHa induziu o Lh e não o Fsh em nível transcricional e antecipou a maturação final de fêmeas maduras (Kitahashi et al., 1998).

Em teleósteos, o GnRH pode atuar sobre a síntese e liberação do Gh, o qual participa no eixo gonadotrófico, contribuindo na gametogênese e esteroidogênese (Chang e Wong, 2009). No entanto, não conseguimos observar uma relação entre o uso do implante de sGnRHa com a expressão do *gh* em pacu. Corroborando os resultados já descritos em bagre africano, (*Clarias gariepinus*) (Lescroart et al., 1996; Bosma et al., 1997), no qual também não foi encontrada associação entre o GnRH e as concentrações do Gh. Contudo, cabe resaltar que a ação do GnRH sobre a expressão gênica e conseqüentemente sobre a concentração plasmática de Gh pode ser dependente do estágio de maturação gonadal (Sumpter et al., 1991; Bjornsson et al., 1994; Gomez et al., 1999) ou estação (Bhandachi et al., 2003). Assim, o papel do Gh na reprodução

do pacu e de outras espécies reofílicas sul-americanas de desova total continua desconhecido, de modo que estudos específicos sobre o Gh são necessários, principalmente pelo fato desta substância estar presente nos extrato bruto de hipófise amplamente utilizado em teleósteos nativos e por seu papel na reprodução de teleósteos ainda ser pouco conhecido.

Com os resultados encontrados no presente estudo, sugerimos uma ação mais intensa dos implantes na via do Lh, que promove maturação final e desova, e menos intensa na via do Fsh, que promove a vitelogênese (Nagahama e Yamashita, 2008). Assim são perfeitamente compatíveis os valores similares de E₂ encontrados para fêmeas tratadas e controles, mesmo após a introdução dos implantes, pois estes aparentemente não estimularam a via do FSH. Sabe-se que em peixes reofílicos sul-americanos ocorre uma intensificação do processo vitelogênico concomitante à uma elevação na concentração plasmática de E₂ (Hainfellner et al., 2012b). Os perfis da concentração plasmática de E₂ em fêmeas tratadas e controles de pacu foram similares aos perfis descritos para outros peixes reofílicos analisados (Gazola e Borella, 1997; Arantes et al., 2010; Hainfellner et al., 2012b), com respectiva elevação e redução na fase vitelogênica e de desova.

Seguindo a mesma lógica, deveríamos esperar valores superiores de 17 α -OHP nas fêmeas tratadas, mas encontramos valores similares ao dos controles. Porém, neste estudo nós avaliamos os valores apenas do precursor da DHP, a qual é a mais potente substância indutora de maturação final e ovulação em teleósteos. Assim os valores 17 α -OHP (precursor de DHP), mesmo numericamente superiores nas tratadas, foram estatisticamente similares entre tratadas e controles. No entanto, esta substância não é a principal responsável pela maturação final e desova em teleósteos e a análise de suas concentrações permite apenas conclusões limitadas. A DHP não foi dosada pela ausência de kits comerciais por ELISA. O DHP é normalmente dosado pela técnica de radioimunoensaio apenas em laboratórios que desenvolveram protocolos e anticorpos específicos, sendo de difícil acesso.

Devemos mencionar também que a ausência de um paralelo entre os resultados relativos à expressão do *fshb*, *lhb* e *gh* com os de concentração plasmática de esteroides gonadais podem ter ocorrido em razão das longas janelas entre os períodos de análise. Devido a fragilidade do peixe ao manejo,

com consequente aumento no cortisol sérico (Abreu et al., 2009), não foi possível amostrar animais em períodos menos espaçados, quando um reflexo do uso implantes na concentração plasmática dos esteroides poderia se mostrar mais evidente. A fragilidade ao manejo desta e de outras migradoras são fortes empecilhos para o conhecimento de sua biologia reprodutiva.

De qualquer modo, considerando as dificuldades de uma proposta pioneira, observamos uma ação dos implantes evidente sobre a via do Lh, mas não sobre a do Fsh. Em termos práticos, tomando-se como base os resultados aqui obtidos duas grandes possibilidades em caminhos distintos podem ser visualizadas. Primeiramente, se quisermos aprofundar as respostas no sentido de promover uma intensificação do processo vitelogênico, aparentemente o uso do sGnRHa pode ser substituído por Fsh ou E₂, pois o implante de sGnRHa aparentemente não ativa a via do Fsh com a intensidade necessária. Uma segunda opção seria intensificar as respostas obtidas neste trabalho aumentando a dose do implante de sGnRHa visando promover a maturação final e ovulação das fêmeas com uso destes implantes, embora o uso de implantes de GnRHa de mamífero em “yamú” (*Brycon siebenthalae*), tenha se mostrado ineficiente em induzir a desova (Pardo-Carrasco et al., 2002). Esta seria uma quebra do paradigma sobre a indução à desova em peixes reofílicos em ambiente de cultivo, que envolve uma única dose elevada de extrato bruto de hipófise, o qual provoca um pulso único e muito elevado de Lh (Mylonas e Zohar, 2001; Mylonas et al., 2010). Neste contexto, poderiam ser definidos protocolos onde as fêmeas receberiam os implantes de sGnRHa, e permaneceriam por dias no laboratório até desovarem.

Os dados aqui obtidos mostraram que o uso de implantes de sGnRHa podem ser utilizados para que maior número de fêmeas de pacu apresente-se aptas para indução hormonal na época de desova. Os mecanismos que provocaram estes resultados não puderam ser totalmente elucidados com as técnicas, períodos e intervalos amostrais empregados. A escassez de estudos com o uso destes implantes em peixes sul-americanos de desova total torna limitado o espectro de análise dos resultados obtidos, ficando clara a necessidade de mais estudos deste tipo, principalmente avaliando o efeito de outros tipos de implantes, com uso de diferentes hormônios e em distintas concentrações e considerando também outras espécies.

Observamos uma clara associação entre o uso de implantes e elevação na expressão gênica de *lhb* e não de *fshb*, no entanto esta elevação não refletiu em elevação significativa nos níveis de 17α -OHP, mas sim numa frequência maior de fêmeas aptas à indução hormonal aos 35 dci. Neste contexto, mais estudos são necessários acerca de aspectos endócrinos do processo de maturação ovariana do pacu, principalmente aqueles específicos sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, para fomentar novas tentativas aplicadas de incrementar a reprodução da espécie.

5. Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela agência Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na forma de auxílio a pesquisa (Processo FAPESP nº 2010/05286-1), bolsa de doutorado (Processo FAPESP nº 2010/00825-1), e também pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) (bolsista da CAPES – Processo BEX 8501/11-4) e pelo Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Unesp do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) o qual também agradecemos pelas condições e estruturas fornecidas.

6. Referências

- Abreu, J.S., Takahashi, L.S., Hoshiba, M.A., Urbinati, E.C., 2009. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. Braz J Biol. 69, 415–421.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl Acids Res. 25, 3389-3402.
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2010. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. Anim Reprod Sci. 118, 330–336.

- Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., Rosenfeld, H., 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 212–221.
- Barbaro, A., Franceson, A., Bertotto, D., Bozzato, G., DiMaria, I., Patarnello, P., Furlan, F., Colombo, L., 2002. More effective induction of spawning with long-acting GnRH agonist in the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. (Sciaenidae, Teleostei), a valuable candidate for Mediterranean mariculture. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 192–199.
- Bhandari, R.K., Taniyama, S., Kitahashi, T., Ando, H., Yamauchi, K., Zohar, Y., Ueda, H., Urano, A. 2003. Seasonal changes of responses to gonadotropin-releasing hormone analog in expression of growth hormone/prolactin/somatolactin genes in the pituitary of masu salmon. *Gen Comp Endocrinol.* 130, 55-63.
- Bjornsson, B.T. 1997. The biology of salmon growth hormone daylight to dominance. *Fish Physiol Biochem.* 17, 9–24.
- Bobé, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 165, 535–548.
- Bock, C.L., Padovani, C.R., 2000. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. *Acta sci., Biol. sci.* 22, 495-501.
- Bogerd, J., Blomenrohr, M., Andersson, E., van der Putten, H.H., Tensen, C.P., Vischer, H.F., Granneman, J.C., Janssen-Dommerholt, C., Goos, H.J., Schulz, R.W., 2001. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod.* 64, 1633–1643.
- Bosma, P.T., Kolk, S.M., Rebers, F.E.M., Lescroart, O., Roelants, I., Willems, P. H.G., Schulz, R.W. 1997. Gonadotrophs but not somatotrophs carry gonadotrophin-releasing hormone receptors: Receptor localization, intracellular calcium, and gonadotrophin and GH release. *J Endocrinol.* 152, 437–446.
- Breton, B., Weil, C., Sambroni, E., Zohar, Y., 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRHa on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 91, 371–383.
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg?. *Rev Fish Biol Fisher.* 7, 387-416.
- Campbell, P. M., Pottinger, T. G., Sumpter J. P., 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol Reprod.* 47, 1140–1150.

- Campbell, P. M., Pottinger, T. G., Sumpter J. P., 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*. 120, 151–169.
- Carolsfeld, J., Ramos, S. M., Ormanezi, R., Gomes, J. H., Barbosa, J. M., Harvey, B., 1988. Analysis of Protocols for Application of LHRH Analog for Induced Final Maturation and Ovulation of Female Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887). *Aquaculture*. 74, 49–55.
- Carral, J.M., Rodriguez, R., Celafda, J.D., Saez-Royuela, A., Aguilera, A., Melendre, P., 2003. Successful gonadal development and maturation of tench (*Tinca tinca* L.) in small concrete ponds. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 130–131.
- Chang, C.F., Yueh, W.S., Lee, M.F., Schally, A.V., 1995. A microencapsulated analog of LH-RH accelerates maturation but without stimulating sex reversal in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Reprod. Nutr. Develop.* 35, 339–349.
- Chang, J.P., Wong, A.O.L., 2009. Growth Hormone Regulation in Fish: A Multifactorial Model with Hypothalamic, Peripheral and Local Autocrine/Paracrine Signals, In: Bernier, N.J., Van Der Kraak, G., Farrell, A.P., Brauner, C.J., (Eds), *Fish Physiology*, Vol. 28, Academic Press, Burlington, Vermont, pp. 151-195.
- Crim, L.W., Sherwood, N.M., Wilson, C.E., 1988. Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture* 74, 87–95.
- Criscuolo-Urbinati E., Kuradomi R.Y., Urbinati, E.C., Batlouni, S.R., 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology*, 78, 2087-2094.
- Fornies, M.A., Mananos, E., Carrillo, M., Laureau, S., Mylonas C.C., Zohar Y., Zanuy, S., 2001. Effectiveness of different GnRHa-delivery systems on spawning induction in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 202, 221-234.
- Gardes, L., Villanove, P., Buchet, V., Fauvel, C., 2000. Induced spawning of red drum, *Sciaenops ocellatus*: use of multivariate and univariate analysis methods in the search for side effects of LHRHa treatments and ovarian development state upon spawn quality. *Aquat. Living Resour.* 13, 19–27.
- Gazola, R., Borella, M. I., 1997. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Braz J Med Biol Res.* 30, 1485–1487.
- Godinho, H. P., Godinho, A. L., 1986. Induced Spawning of the Pacu, *Colossoma mitrei* (Berg 1895) by Hypophysation with Crude Carp Pituitary Extract. *Aquaculture*. 55, 69-73.

- Hainfellner, P., De Souza, T.G., Muños, M.E. Freitas, G. A., Batlouni, S.R., 2012a. Spawning failure in *Brycon amazonicus* may be associated with ovulation and not with final oocyte maturation. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 64, 515-517.
- Hainfellner, P., De Souza, T.G., Moreira, R.G., Nakaghi, L.S.O., Batlouni, S.R., 2012b. Gonadal steroids levels and vitellogenesis in the formation of oocytes in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Teleostei: Characiformes). *Neotrop ichthyol.* 10, 601-612.
- Harmin, S.A., Crim, L.W. and Wiegand, M.D., 1995. Manipulation of the seasonal reproductive cycle in winter flounder, *Pleuronectes americanus*, using a gonadotropic hormone-releasing hormone. *Mar. Biol.* 121, 611–619.
- Kitahashi, T., Alok, D., Ando, H., Kaeriyama, M., Zohar, Y., Ueda, H., Urano, A., 1998. GnRH analog stimulates gonadotropin II gene expression in maturing sockeye salmon. *Zool Scien.* 15, 761–765.
- Lee, C.S., Tamaru, C.S., Banno, J.E. and Kelley, C.D., 1986. Influence of chronic administration of LHRH-analogue and/or 17 α -methyltestosterone on maturation in milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture* 59, 147–159.
- Leonardo, A.F.G., Romagosa, E., Batlouni S.R., Borella, M.I., 2006. Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 58, 831-840.
- Lescroart, O., Roelants, I., Mikolajczyk, T., Schulz, R.W., Bosma, P.T., Khun, E.R., Ollevier, F. 1996. A radioimmunoassay for African catfish growth hormone: Validation and effect of substances modulating the release of growth hormone. *Gen Comp Endocrinol.* 104, 147–155.
- Lima, R.V.A., Bernardino, G., Val-Sella, M.V., Fava-de-Moraes, F., Schemy, R.A., Borella, M.I., 1991. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos e cativoiro. *Bol Téc CEPTA.* 4, 1-46.
- Mañanós, E., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Mylonas C.C., Asturiano, J.F., Bayarri, M.J., Zohar, Y., Zanuy, S., 2002. Luteinizing hormone (LH) and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH α). *J Fish Biol.* 60, 328-339.
- Marino, G., Panini E., Longobardi A., Mandich A., Finoia M.G., Zohar Y., Mylonas C.C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRH α implant. *Aquaculture*, 219, 841-858.

- Mateos, J., Mananos, E., Carrillo, M., Zanuy, S., 2002. Regulation of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean sea bass. *Comp Biochem Physiol B*. 132, 75–86.
- Mosconi, G., Carnevali, O., Habibi, H.R., Sanyal, R., Polzonetti-Magni, A.M., 2002. Hormonal mechanisms regulating hepatic vitellogenin synthesis in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Am J Physiol*. 283, C673–C678.
- Mylonas, C.C., Hinshaw, J.M., Sullivan, C.V., 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture*. 106, 379-392.
- Mylonas, C.C., Tabata Y., Langer R., Zohar Y., 1995. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *J Control Release*. 35, 23-34.
- Mylonas, C.C., Scott, A.P., Vermeirssen, E.L.M., Zohar, Y., 1997a. Changes in plasma gonadotropin II and sex steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release gonadotropin-releasing hormone agonist-delivery systems. *Biol. Reprod*. 57, 669–675.
- Mylonas, C.C., Woods L.C., Thomas P., Zohar Y. 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during post-vitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *Gen Comp Endocr*. 110, 276-289.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev Fish Biol Fish*. 10, 463–491.
- Mylonas, C.C., Sigelaki, I., Divanach, P., Mañanós E., Zanuy, S., Afonso-Polyviou, A., 2003. Multiple spawning of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after repeated injections of GnRHa, and evaluation of egg quality. *Aquaculture*. 221, 605-620.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte: from Basic Studies to Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 433–470.
- Mylonas, C.C., Bridges, C.R., Gordin, H., Belmonte Ríos, A., García, A., De la Gándara, F., Fauvel, C., Suquet, M., Medina, A., Papadaki, M., Heinisch, G., De Metrio, G., Corriero, A., Vassallo-Agius, R., Guzmán, J.M., Mañanos, E., Zohar, Y., 2007. Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Rev. Fish. Sci*. 15, 183–210.

- Mylonas, C. C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocr.* 165, 516–534.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop Growth Differ.* 50, S195-S219.
- Pardo-Carrasco, S.C., Suarez-Mahecha, H., Muñoz-Lara, D., Arias-Castellanos, J. A., Gil, G., 2002. Inducción de la ovulación y del desove del yamú, *Brycon siebenthalae*, con implantes de mGnRH-a. *Bol. do Instit. de Pesca.* 28, 19-24.
- Parhar, I.S., Soga, T., Ogawa, S., Sakuma, Y., 2003. FSH and LH β subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. *Gen Comp Endocr.* 132, 369–378.
- Romagosa, E., Paiva, P., Godinho, H.M., 1990. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895), induced to spawn. *Aquaculture.* 86, 105-110.
- Romagosa, E., Godinho, H. M, Braga, F. M., 1993. Mudanças morfológicas dos ovários de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. *Bol Inst Pesca.* 20, 67-80.
- Santos, J.E., Bazzoli, N., Rizzo, E., Santos, G.B., 2004. Reproduction of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken) (Pisces, Siluriformes) in Furnas reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Zool.* 21, 193-200.
- Schreck, C. B., 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *Gen Comp Endocr.* 165, 549–556.
- Solórzano, L., 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. *Limnol Oceanogr.* 14, 799-801.
- Sumpter, J.P., Lincoln, R.F., Bye, V.J., Carragher, J.F., Le Bail, P.Y. 1991. Plasma growth hormone levels during sexual maturation in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 83, 103–110.
- Trudeau, V.L., Peter, R.E., Sloley, B.D., 1991. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. *Biol Reprod.* 44, 951–960.
- Trudeau, V.L., 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod.* 2, 55–68.
- Zaniboni – Filho, E., Weingart, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev Bras Reprod Anim.* 31, 367-373.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores para clonar e expressão gênica (RT-qPCR) dos genes que codificam para o *hormônio luteinizante subunidade beta (lhb)*, *hormônio folículo estimulante subunidade beta (fshb)*, *hormônio do crescimento (gh)* e *fator de 1 alongação 1 Alfa (ef1α)*.

genes		senso	anti-senso
clonagem	<i>lhb</i>	5' - TCTSTGGAGAAGGADGGCTG - 3'	5' - CGAWGGTRCAGTCGGANGTG - 3'
	<i>fshb</i>	5' - CCATGGTGTTGCTGTTGCC - 3'	5' - CAGMTRCTBGGCTGCATGCT - 3'
	<i>ef1α</i>	5' - TCGTTGCTGCTGGTGTGG - 3'	5' - TGGGTGGGTCGTTCTTGCT - 3'
RT-qPCR	<i>lhb</i>	5' - CCTGGTGTTTCAGACCAGCAT - 3'	5' - CGTGCTGATAGATGGTGGAGAA - 3'
	<i>fshb</i>	5' - AAGAATGCGGGAGCTGCA - 3'	5' - GGTCTCATACGTCCACTCCCTAAA - 3'
	<i>gh</i>	5' - TGGCAAAGATGAGACCCAGAA - 3'	5' - GGGTACTCCCAAGACTCGATCAG - 3'
	<i>ef1α</i>	5' - TCTGGATGGCACGGAGACA - 3'	5' - CAATCTTCCATCCCTTGAACCA - 3'

Os códigos usados: B = T+C+G; D = A+G+T; S = G+C; M = A+C; N = A+C+G+T; R = A+G; W = A+T.

Tabela 2 – Comprimento padrão (L_s), largura do abdômen (W_A), massa total (W_T) e índice W_A/L_s de fêmeas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), comparando peixes tratadas (sGnRHa – 150 µg) e controle. dci – dias após introdução do implante. Médias±EP.

variáveis	controle				tratado			
	“dia 0” (25/10/2010)	21 dci (15/11/2010)	35 dci (29/11/2010)	115 dci (17/02/2011)	“dia 0” (25/10/2010)	21 dci (15/11/2010)	35 dci (29/11/2010)	115 dci (17/02/2011)
L_s (cm)	42,83±3,18	42,45±2,45	42,95±1,86	43,61±1,03	41,35±1,79	42,74±2,96	41,16±3,01	40,65±3,76
W_A (cm)	5,94±0,76	5,51±0,67	5,53±0,75	5,47±0,71	4,96±0,57	5,02±0,83	4,85±0,67	4,79±0,68
W_T (g)	2858±206	2508±424	2593±392	2780±224	2290±537	2468±688	2034±349	2026±533
W_A/L_s	0,13±0,01	0,12±0,00	0,12±0,01	0,13±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01	0,12±0,00	0,12±0,01
n	9	4	7	3	9	4	7	3

Tabela 3 – Valores médios dos índices (médias±EP) corpóreos e fecundidade de fêmeas de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) tratadas (sGnRHa – 150 µg) e controles. IHS – índice hepatossomático, IGS – índice gonadosomático, IVS – índice viscerossomático, IGV- índice de gordura visceral e FA- fecundidade absoluta (oócitos/g de ovário). dci – dias após introdução do implante. Os asteriscos indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma data (P<0,05).

variáveis	controle		tratadas	
	35 dci (29/11/2010)	115 dci (17/02/2011)	35 dci (29/11/2010)	115 dci (17/02/2011)
IHS	0,78±0,03*	0,68±0,08*	0,94±0,03	0,96±0,08
IGS	3,63±0,60	4,82±1,28	4,47±1,19	4,49±0,21
IVS	6,01±0,48	6,53±2,58	6,77±0,38	4,37±2,37
IGV	2,59±0,38	2,13±1,13	3,02±0,38	1,35±0,55
FA	920±80	970±71	880±174	888±260
n	5	3	5	3

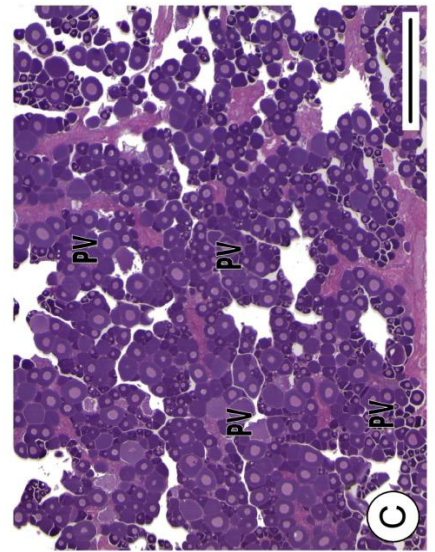
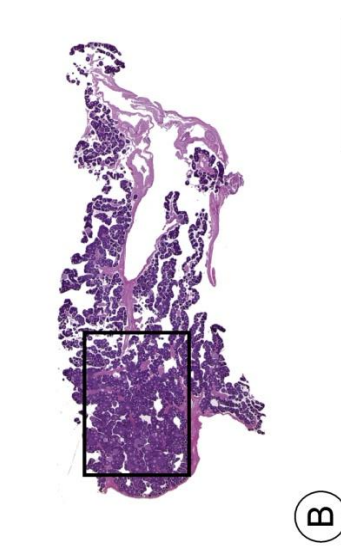
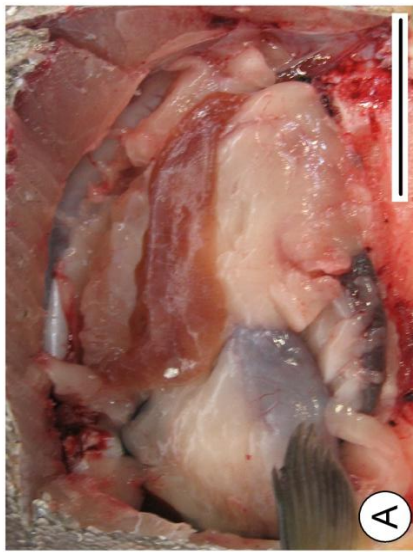
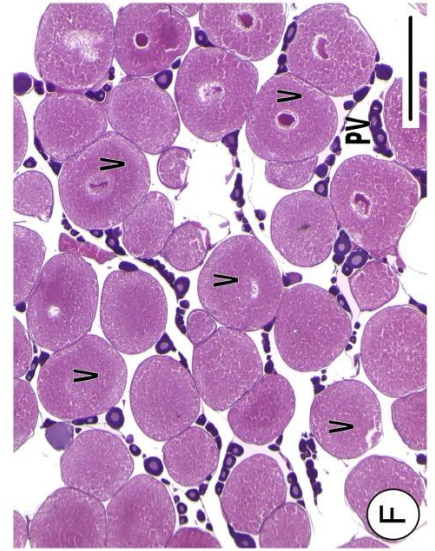
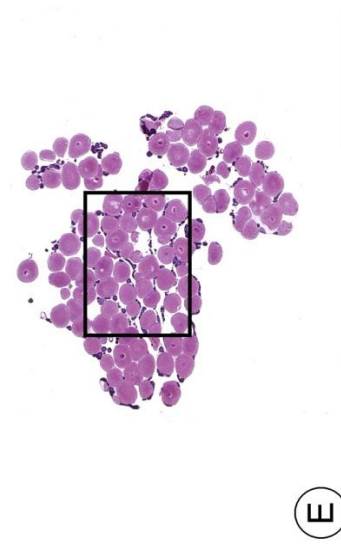
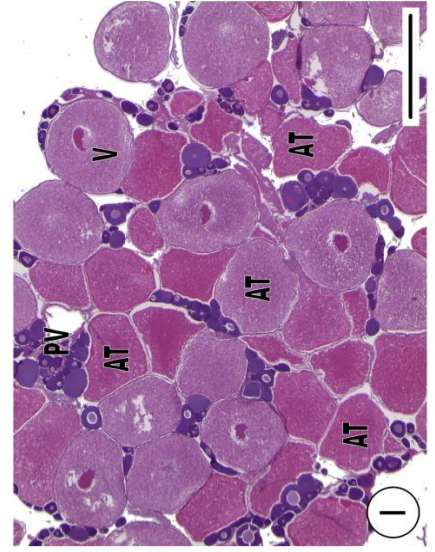
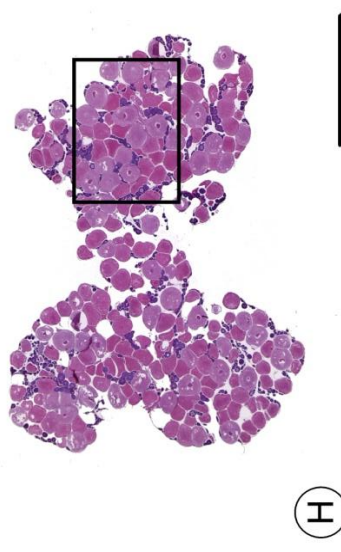
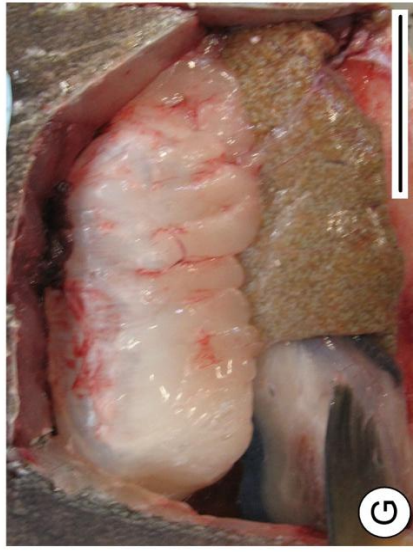


Fig. 2 – Figuras ilustrativas de ovários (A, D e G) e fotomicrografias de cortes histológicos dos ovários (B,C, E, F, G e I) de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas fases de: repouso (A-C), maturação avançada (D-F) e regressão (G-I). Nas figuras, B, E e H as moldura (□) representa a área amplificada nas figuras C, F e I. Oócitos pré-vitelogênicos (PV), vitelogênicos (V) e atrésicos (AT). Barras de escala = 5 cm (A, D e G), barras de escala = 5 mm (B, E e H) e barras de escala = 1 mm (C, F e I).

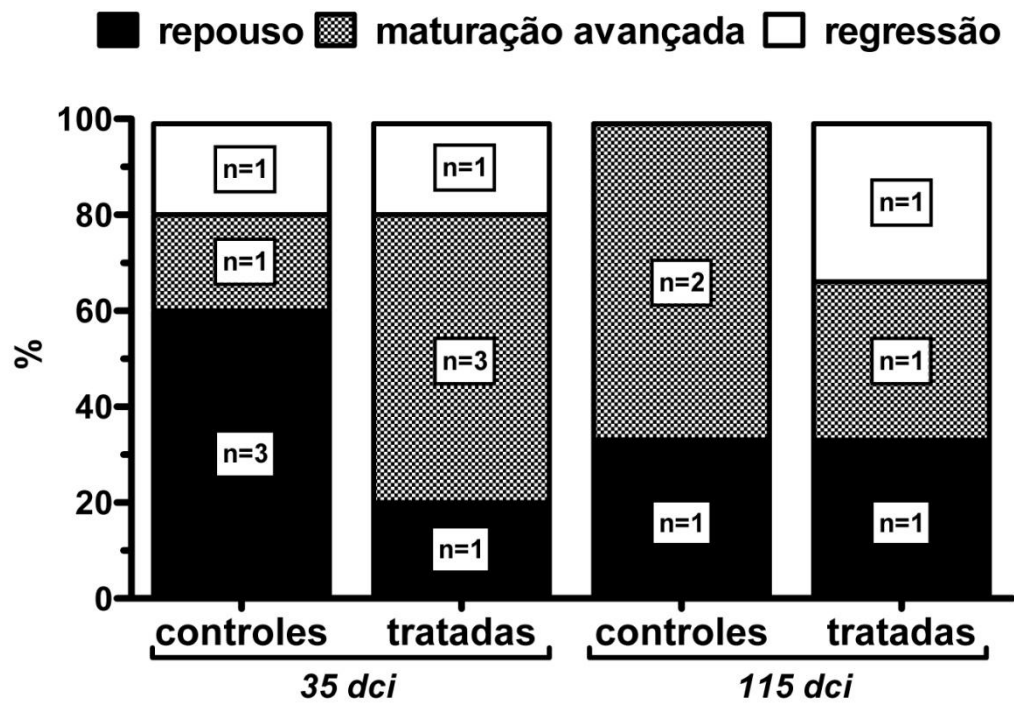


Fig. 3 – Frequência de ovários de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) classificados por histologia em: repouso, maturação avançada e regressão. dci – dias após introdução do implante.

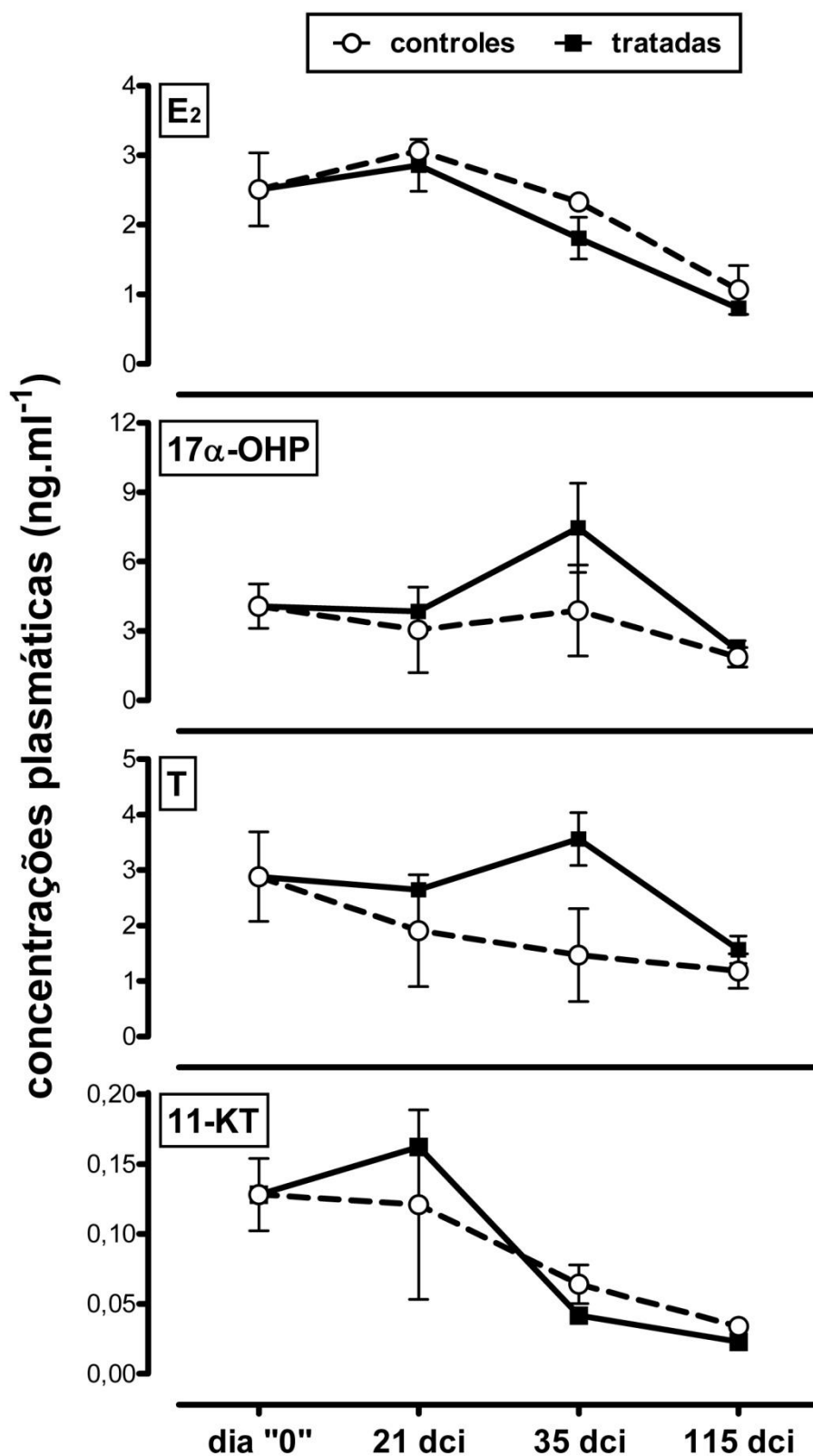


Fig. 4 – Valores médios (média \pm EP) observados para concentração plasmática dos hormônios esteroides: 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP), 17 β -estradiol (E₂), testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) de fêmeas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) tratadas (sGnRHa – 150 μ g) e controles ao longo da estação reprodutiva. dci – dias após introdução do implante. dia "0" – início do experimento.

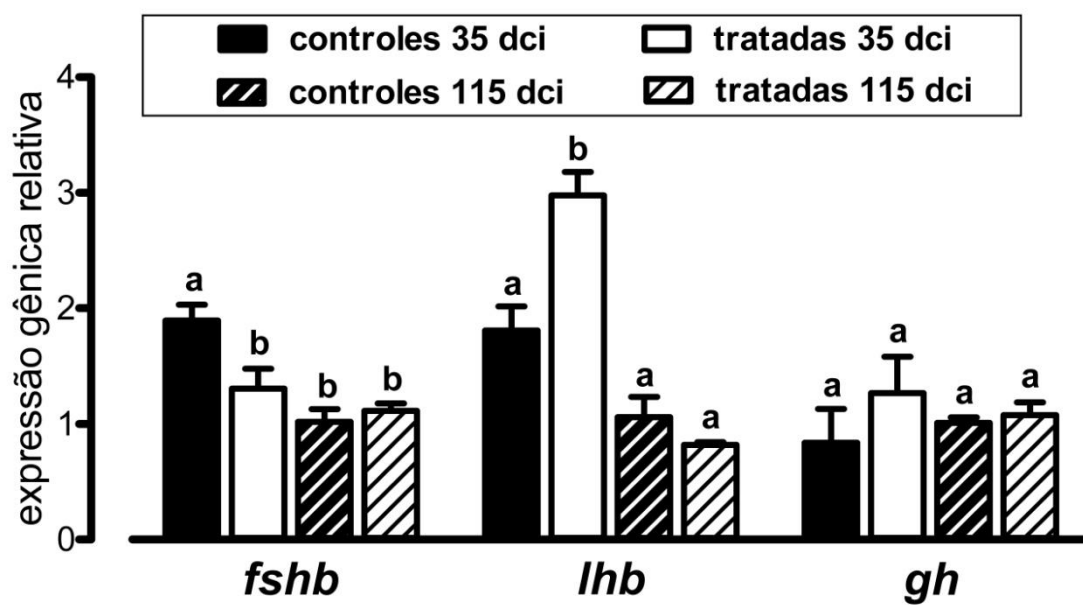


Fig. 5 – Expressão gênica relativa (média±EP) comparando fêmeas de pacu tratadas (sGnRHa – 150 µg) e controles. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos (p<0,05).

MANUSCRITO II

Reespermição e características seminais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) durante o período de reprodução

artigo a ser submetido à revista "Biology of Reproduction"

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar as características do sêmen do pacu ao longo da estação reprodutiva, bem como em animais reespermados. Para isto, reprodutores foram induzidos à espermiacção no início (n=7), meio (n=5) e final (n=4) da estação reprodutiva. Os machos “reespermados” foram induzidos à espermiacção no início e novamente no meio (n=4). A indução consistiu em dose única de acetato de buserelina (10µg/kg de peixe) e domperidona (5 mg/kg de peixe). Foram avaliadas as características e qualidade do sêmen e espermatozoides, a concentração plasmática de esteroides gonadais, o estágio de desenvolvimento testicular e a expressão gênica de *subunidade beta do hormônio folículo estimulante (fshb)*, *subunidade beta do hormônio luteinizante (lhb)* e do *hormônio do crescimento (gh)* na hipófise. Observamos que o volume de sêmen liberado aumentou ao longo da estação reprodutiva, porém, o número absoluto de espermatozoides liberados foi constante. Ao longo da estação reprodutiva, a composição iônica (Ca^{+2} , Na^{+2} , K^+ , Mg^{+2} e Cl^-) e parâmetros físicos e químicos (pH, osmolaridade) do sêmen foram similares, exceto a concentração plasmática de proteínas, que foi superior no final. Praticamente todos os parâmetros relativos à qualidade dos espermatozoides apresentaram queda substancial no final da época reprodutiva, principalmente à qualidade do DNA. Observamos uma forte associação entre a liberação de sêmen de boa qualidade e elevação de 11-cetotestosterona durante a indução hormonal. Todos os machos submetidos a reespermiação responderam positivamente ao tratamento e a reespermiação se mostrou uma excelente alternativa para a espécie, com produção de sêmen de excelente qualidade e volume considerável. A reespermiação pode ser utilizada para aumentar o volume de sêmen total obtido em um plantel de machos, além de renovar o sêmen aumentando a qualidade do mesmo.

Abstract

The aim of this study was evaluate the seminal characteristics of pacu over the spawning season. Breeders were utilized at the beginning (n=7); middle (n=5) and end (n=4) of breeding season. The restripped group was formed by males stripped at the beginning and restripped again in the middle of season (n=4). The spermiation inductions were done by single dose of buserelin acetate (10 µg/kg) plus of domperidone (5mg/kg). We performed comparative analysis of seminal and sperm quality, the gonadal steroids plasma levels, stage of spermatogenesis, and pituitary *follicle-stimulating hormone beta subunit (fshb)*, *luteinizing hormone beta subunit (lhb)* and *growth hormone (gh)* gene expression. We observed increase in the milt volume over time, notwithstanding the sperm density did not have varied. Characteristics of ionic composition (Ca^{+2} , Na^{+2} , K^{+} , Mg^{+2} and Cl^{-}), chemical and physical characteristics (pH and, osmolality) of the semen were alike all along breeding season, except the concentration of seminal plasma protein that increased over time. The sperm had substantial decreases in most of indexes at the end of spawn season, mainly as regards the DNA quality. We observed a strong association between the good quality semen and the capacity of breeders to raise the 11-ketotestosterone plasma concentration during hormonal induction. All males that were submitted to restripping answered positively the treatment and restripping shown to be a great management to pacu, allowing high quality semen and considerable milt volume. The restriping might be used to increase the milt volume obtained from breeders, in addition to renew their semen and improving the quality.

Introdução

O pacu é uma espécie reofílica (migradora) que apresenta ciclo reprodutivo sazonal [1]. A reprodução ocorre entre novembro e janeiro e o processo de maturação das gônadas se torna mais evidente em setembro e outubro, atingindo estádios mais avançados de maturação entre outubro e janeiro [2].

Durante a estação reprodutiva, podem ocorrer variações nas características do sêmen de teleósteos, tais como: volume, densidade espermática, motilidade, tempo de motilidade, morfologia, pH, entre outras já relatadas em espécies marinhas [3-7] e de água doce [8-12], incluindo teleósteos hormonalmente revertidos em machos [13].

De acordo com Bobe & Labbé [14], diversos fatores podem afetar a qualidade do sêmen, tais como: estresse, nutrição, fotoperíodo, salinidade, temperatura, época reprodutiva, material genético e diversos aspectos da indução hormonal [14]. A avaliação da qualidade do sêmen e dos espermatozoides é complexa [15] e, em teleósteos, os parâmetros mais comumente usados são: volume, concentração de espermatozoides, osmolaridade, pH, íons, concentração de ATP (adenosina trifosfato), motilidade (número de células móveis), e morfologia [16]. Dentre estes, a motilidade e o tempo de motilidade são considerados os principais parâmetros, pois se relacionam diretamente com a capacidade de fertilização [17].

Em teleosteos reofílicos sul-americanos, os espermatozoides permanecem estocados nos testículos por longo período, uma vez que os mesmos começam a ser produzidos meses antes do período reprodutivo [18-20]. O tempo aproximado para formação de espermatozoides dependendo da espécie e temperatura (a partir da fase de pré-leptoteno) em teleósteos é de 5 a 14 dias [21], mas os mesmos começam a ser produzidos em junho para serem espermiados entre dezembro e fevereiro [22], e, nos teleósteos, estes normalmente não passam por processos de maturação nos testículos como em mamíferos [23]. Neste contexto, a reespermiação pode ser uma interessante alternativa para eliminar espermatozoides “velhos” e propiciar a coleta de espermatozoides “novos” (teoricamente de melhor qualidade) algumas semanas após a primeira espermição. A reespermiação já foi descrita em trutas, e pode ser realizada mais

de uma vez por período reprodutivo [24, 25]. Além disso, em peixes reofílicos sul-americanos é descrito que a espermatogênese se mantém constante durante o período de espermiacção, pois parte do epitélio germinativo dos testículos é “contínuo” [18] e permanece com função espermatogênica e espermiogênica [20].

Em teleósteos, a dopamina (DA) e o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) respectivamente, inibem e estimulam a espermiacção e a reprodução [63]. Nos machos, ambos as GtHs, o hormônio folículo estimulante (Fsh) e o hormônio luteinizante (Lh) são indutores da esteroidogênese [60-62]. O Fsh em “zebrafish” (*Danio rerio*) é capaz de estimular tanto a espermatogênese quanto a esteroidogênese, enquanto que o Lh parece exercer uma ação mais aguda, provavelmente nos momentos em que picos de esteroides são necessários [64]. Dentre os hormônios esteroides, destacamos a 11-cetotestosterona (11-KT), como o principal hormônio secretado em resposta as GtHs em machos [52,53,55]. Outros hormônios esteroides, com função menos conhecida, como o estradiol (E₂) e as progestinas estão envolvidos, respectivamente, com a renovação das espermatogônias [65,66] e com o processo de espermiacção [67].

Além das GtHs, o GnRH também pode induzir a síntese e liberação do hormônio do crescimento (Gh) [68], cuja ação parece ser dependente do estágio de maturação gonadal [69,70] ou estação do ano [71]. O Gh, por sua vez, atua sobre as células gonadotróficas hipofisárias como inibidor na liberação do Lh, porém, indutor da expressão do mesmo. Por outro lado, o Lh atua sobre as células somatotróficas hipofisárias como um indutor da liberação e expressão gênica do Gh [72].

Dentro deste contexto, os objetivos do presente estudo foram os de se determinar as características do sêmen do pacu *P. mesopotamicus* ao longo da estação reprodutiva, e após a reespermiacção, além de monitorar os níveis médios dos esteroides gonadais e expressão gênica do gh, lhb e fshb na hipófise.

Material e métodos

Mantença, indução hormonal e amostragens

Os reprodutores de quatro anos de idade foram mantidos em viveiros escavados de 200 m³ em uma densidade de estocagem de 0,25 peixe/m³ no

Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP (Jaboticabal, SP). Uma renovação constante de $\cong 20$ l/min foi mantida durante todo o período experimental, sendo que a temperatura variou de 26 a 32°C (média \pm DP – 29,5 \pm 1,0°C) durante a estação reprodutiva (de novembro de 2010 a fevereiro de 2011). Os peixes foram arraçoados com ração comercial (Guabi, Campinas, SP, BR – composto por 32,0% proteína bruta, 6,5% extrato etéreo, 10,0% cinzas e 7,0% matéria fibrosa) duas vezes ao dia *ad libitum*. Todos os peixes utilizados foram eutanasiados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp (Jaboticabal, SP, BR).

No período inicial (n=7), intermediário (n=5) e final (n=4) da estação reprodutiva, os reprodutores foram coletados aleatoriamente, levados ao laboratório, aclimatados em tanques de 1000 L e submetidos à indução hormonal (dose única de 10 μ g/kg de peixe de acetato de buserelina - Sincroforte (Ourofino Agronegócio, Cravinhos, SP, BR) e 5 mg/kg de peixe de domperidona (Ranbaxy, Dewas, MP, IN)). Em cada período, foram utilizados machos não-espermiados (na estação) identificados pela numeração do chip. O grupo “reespermiado” foi composto por machos espermiados pela primeira vez no início da estação e espermiados novamente no período intermediário (n=4).

Imediatamente antes da indução hormonal, os reprodutores foram anestesiados (com uma solução de benzocaina em uma concentração de 100 mg/l de água), pesados (massa total – W_T), medidos (comprimento padrão – CP) e o fator de condição K foi determinado ($K = [(peso\ total\ (g) \times comprimento\ padrão^3(cm)) \times 100]$). Amostras de sangue (± 3 mL) foram colhidas da veia caudal em seringas contendo EDTA antes da indução e após espermição. O plasma foi separado centrifugando-se as amostras a 1500 \times g por 15 min a 4 °C, e então armazenado a -80°C até o momento da quantificação da concentração dos hormônios esteroides

Após a espermição, os reprodutores foram eutanasiados (por overdose de anestésico (300 mg/l de benzocaina). Os testículos, fígado e vísceras foram removidos, pesados e os seguintes índices foram determinados: gonadosomático, hepatossomático, viscerossomático. Todos os índices foram calculados de acordo com a seguinte fórmula índice= $[(massa\ do\ órgão(g) / W_T (g)) \times 100]$. Os fragmentos das regiões cranial, médio e caudal dos testículos foram fixados em solução (pH 7,3) de 2,5% de glutaraldeído em PBS (0,05 M) por 24 horas e então

estocados a 4°C em PBS (0,05 M, pH 7,3) até serem processados histologicamente. A hipófise e fragmentos dos testículos foram preservados em RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) e armazenados a -80°C até a extração de RNA total.

Análises histológicas e hormônios esteroides

Os fragmentos de testículos foram incluídos em resina glicol metacrilato (Leica historesin embedding kit, Leica Microsystems, Nussloch, DE). Posteriormente, secções de 2 µm foram obtidas e coradas com hematoxilina-floxina B. Os estágios da espermatogênese foram classificados de acordo com a presença, abundância e estágio da espermiogênese, sendo o estágio I – presença de espermatogônia tipo A e B; estágio II – presença de espermatogônia e espermátocitos; estágio III – presença de espermátides; estágio IV – presença de espermatozoides; estágio V – aumento do número de espermatozóide maduros em relação ao estágio IV, enquanto o restante das células germinativas estão em menor proporção; estágio VI – presença apenas de espermatozoides e algumas espermatogônias; estágio VII – quase todos os espermatozoides fagocitados pelas células de Sertoli, restando apenas as espermatogônias primárias e espermatozoides remanescentes nos túbulos, baseando-se no método descritos em outros estudos [26-28]. O estágio de desenvolvimento testicular de cada indivíduo foi determinado.

A concentração plasmática de 17α-hidroxiprogesterona (17α-OHP), 17β-estradiol (E₂), testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) foram determinados por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando kits comerciais (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA para 11-KT e BioCheck, Inc., Foster City, CA, EUA para os demais) seguindo as instruções do fabricante. As placas de 17α-OHP, E₂ e T foram lidas a 450 nm e o 11-KT a 405 nm em um leitor de placas Spectramax 250 (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA). Todas as amostras foram lidas em duplicata.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das hipófises foi extraído utilizando-se RiboPure (Ambion, Austin, TX, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Tanto a quantificação de RNA total quanto a confirmação de presença de DNA foram realizadas por fluorímetro Qubit (Invitrogen) empregando os *kits* Quant-iT RNA Assay (Life Technologies, Eugene, OR, USA) e Quant-iT dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay (Life Technologies, Eugene, OR, USA). A calibração e quantificação foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Não foram observadas amostras contaminadas com DNA. Para avaliação da integridade dos RNAs foi utilizado o Agilent 2100 Bioanalyzer com o *kit* Agilent RNA 6000 Pico (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Foram aceitas amostras com RIN maiores que 8,5.

Para a síntese do cDNA, aproximadamente 2 µg de RNA total foram usados como fita molde para síntese da cDNA com o SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando hexâmeros aleatórios (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 2 µg de RNA total como fita molde.

PCR quantitativo em tempo real

As análises de RT-qPCR foram feitas em duplicata. Foram utilizadas placas ópticas de 96 orifícios e um termociclador ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) em configuração padrão. Os 20 µL totais da reação constituíram-se de 5 µL de cDNA, 900 nM de oligonucleotídeos de iniciação senso, 900 nM de oligonucleotídeos de iniciação anti-senso e 2× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram as mesmas utilizadas no “manuscrito I” desta tese: 5'-CCTGGTGTTCAGACCAGCAT-3' / 5' - CGTGCTGATAGATGGTGGAGAA-3'; 5'-AAGAATGCGGGAGCTGCA-3' / 5'-GGTCTCATACGTCCACTCCCTAAA-3'; 5'-TGGCAAAGATGAGACCCAGAA-3' / 5'-GGGTACTCCCAAGACTCGATCAG-3' e 5'-TCTGGATGGCACGGAGACA-3' / 5'-CAATCTTCCATCCCTTGAACCA-3', nos sentidos senso / anti-senso para as expressões dos genes *lhb*, *fshb*, *gh* e *fator de alongação 1 alfa (ef1a)*, respectivamente. O *ef1a* utilizado como gene normalizador e foi calibrado pela amostragem do meio da estação. A eficiência das reações foi avaliada de acordo com a equação $Ct = m \times (\log Q) + c$, sendo o

“Ct” o limiar do ciclo, “Q’ numero de cópias iniciais, “c” a intercepção sobre o eixo Y e “m” a inclinação [29]. Uma diluição seriada de uma mistura de todas as amostras de cDNA foi realizada e foi encontrado para todos os conjuntos de oligonucleotídeos uma curva padrão com o valor de inclinação “2”, indicando que as reações tiveram ampliações exponenciais. Assim, assumimos que dois ciclos eram necessários para ter um aumento de quatro vezes na quantidade de DNA inicial. Para o cálculo da expressão gênica foi utilizado os método de $\Delta\Delta Ct$, como descrito por Bogerd et al. [29].

Espermição, características quali e quantitativas do sêmen

A espermição foi realizada aproximadamente 12 horas após a indução hormonal. A papila urogenital foi limpa e seca com intuito de se evitar a contaminação do sêmen com fezes, urina e água. Os peixes foram espermiados com uma leve pressão abdominal e o sêmen coletado em tubos graduados (mL) para aferir o volume espermiado (VE). Uma alíquota do sêmen foi gotejada em uma lâmina para checar se os espermatozoides não estavam ativados. Somente em caso de não ativação, os parâmetros de motilidade, tempo de motilidade, densidade e o pH do sêmen foram analisados.

A motilidade espermática foi estimada subjetivamente, por ativação das células com água destilada (1:5 diluição, sêmen: água) e adotando uma escala arbitrária de 0 a 5, sendo: 0 = sem motilidade, 1 \cong 1-25%; 2 \cong 25-50%, 3 \cong 50-75%, 4 \cong 75-90% e 5 \cong 90-100% de espermatozoides móveis [30]. A duração da motilidade foi considerada como sendo o tempo (em segundos) decorrido entre a ativação e até que 50% dos espermatozoides tivessem a natação descontinuada.

Para determinar a concentração espermática, o sêmen foi fixado e diluído (1:2000, sêmen: fixador) em formol salino tamponado. As amostras foram inseridas em hemocitômetro de Neubauer e após 10 min (para depósito das células) as contagens foram executadas em microscópio de luz em objetiva de $\times 40$. A média das contagens foi considerada a densidade espermática (DE) expressa como número de células $\times 10^{11}/\text{mL}$. A produção espermática (PE) foi definida como o produto obtido pelo volume de sêmen (mL) \times a DE. O pH do

sêmen foi mensurado no sêmen fresco utilizando um pH metro HI 4211 (HANNA Instruments, São Paulo, SP, BR).

A motilidade e duração espermática e o pH do sêmen foram avaliados em triplicata e a DE em duplicata. Para todos os parâmetros, a média foi determinada e as avaliações foram feitas pelo mesmo observador.

Viabilidade espermática, morfologia e plasma seminal

Para análise da viabilidade espermática 10 µL de sêmen foram gentilmente misturados com 90 µL de solução de corantes eosina/nigrosina (eosina Y a 5% e nigrosina a 10%). Esta diluição foi utilizada para preparar esfregaços (em duplicata) que foram examinados em microscópio de luz. As células coradas em rosa ou vermelho foram consideradas como mortas e as brancas como vivas. No total, 200 espermatozoides/lâmina foram contados e classificados como vivos/mortos. As médias foram calculadas em cada período e consideradas como viabilidade, expressa pelo percentual de células vivas em relação ao total de células contadas.

Para estimar a morfologia espermática, em uma alíquota de 15µL do espermatozoide fixado em formol salino tamponado foram adicionados 0,5 µL de corante rosa de bengala a 3% para então fazer esfregaço (em duplicata). As lâminas foram secas e analisadas sobre microscópio de luz (×1000 de aumento). Sendo avaliadas 100 células por lâmina, e o número de células com anomalias foi expresso em percentagem em relação ao número total de células avaliadas. As seguintes anomalias foram consideradas: cabeça solta, macrocefálico, microcefálico, cabeça degenerada, gotas citoplasmática proximal e distal, peça média degenerada, cauda dobrada, enrolada, quebrada e curta [31].

Para determinação da composição iônica e osmolaridade, o sêmen de cada pacu foi centrifugado a 10.000 ×g por 20 min a 4°C. O plasma seminal foi então separado e utilizado para determinar as concentrações dos íons Ca^{+2} , Na^{+} e K^{+} (mmol/L) em um analisador de eletrólito (AVL 9180 Electrolyte Analyzer, Roswell, GA, USA). Para determinar a concentração dos íons Mg^{+2} e Cl^{-} foram utilizados *kit* colorimétricos (Labtest, Lagoa Santa, MG, BR). A osmolaridade do plasma seminal (mOsmol/kg) foi aferida em um Vapro Vapor Pressure Osmometer - modelo 5500 (Wescor, Logan, UT, USA) .

A proteína total do plasma seminal foi quantificada por fluorimetria utilizando o fluorímetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e o *kit* Quant-iT Protein Assay (Life Technologies, Eugene, OR, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Os valores resultantes foram expressos em mg/mL.

Integridade do DNA de espermatozoides

A integridade do DNA foi avaliada empregando-se o ensaio cometa (ensaio de eletroforese de células isoladas) de acordo com protocolo proposto por Cabrita e colaboradores [32], com algumas adaptações. Lâminas de microscopia foram cobertas com uma camada de agarose 0,5% um dia antes de serem usadas (primeira camada). A DE foi ajustada para 10×10^6 células/mL com uso de solução não ativadora (PBS- NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; Na_2PO_4 1,15 g; KH_2PO_4 0,2 g; q.s. 1000 mL). Esta solução foi então homogeneizada com solução de agarose (0,5%), formando uma segunda camada que foi depositada sobre a primeira camada. As lâminas, com as duas camadas, foram então imersas em solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 1% N-laurilsarcosina) durante 90 min a 4°C. Após este período, foi adicionado ditiotreitol (10 mM) à solução de lise. As lâminas permaneceram imersas nesta solução por mais 60 min a 4°C e finalmente mantidas na mesma solução de lise foram deixadas a temperatura ambiente por mais 30 min. Antes da eletroforese, as lâminas foram submergidas em solução alcalina (0.3 M NaOH, 1mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH >13) por 20 min a 4°C. As eletroforeses foram executadas por 20 min a 25 V, 300 mA a 4°C. Após a eletroforese, as lâminas foram cobertas com solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5 at 4 °C) (três vezes, cinco min cada), secas, fixadas com etanol por 5 min e armazenadas até serem avaliadas. Lâminas controle foram feitas em todas as eletroforeses. onde a fragmentação do DNA foi induzida por exposição à UV. Para tal, 5 mL de sêmen diluído em PBS foram irradiados com uma lâmpada germicida de 254 nm (TUV 15W/G15T8 - Philips Co., Eindhoven, NL), por 20 min, a temperatura ambiente. A fonte de UV ficou a $\cong 20$ cm de distância das amostras.

Os cometas foram visualizados aplicando-se 50 μL de solução corante (1:3000 – GelRed- Biotium, Hayward, CA, USA: água Milli-Q) sobre as lâminas.

Estas foram cobertas com lamínulas e analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM 5000 B) acoplado à uma câmera digital (Leica DFC300 FX). Fotomicrografias (em objetiva de 40×) foram capturadas utilizando o software Leica Application Suite (LAS v2.7.1). Os cometas foram avaliados visualmente, sendo categorizados em cinco classes: 0, representando células sem danos (cometas com caudas quase indetectáveis ou sem) e 1-4 representando danos crescente do DNA (comprimento da cauda e intensidade). Um total de 100 cometas foram classificados de 0 a 4 em cada amostra. Assim, o índice de danos de DNA (ID) foi calculado conforme a fórmula a seguir [33]:

$$\text{ID} = 0 \times (\text{número total de cometas "classe 0"}) + 1 \times (\text{número total de cometas "classe 1"}) + 2 \times (\text{número total de cometas "classe 2"}) + 3 \times (\text{número total de cometas "classe 3"}) + 4 \times (\text{número total de cometas "classe 4"})$$

Análises estatísticas

Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio dos softwares STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) ou Excel (Microsoft, Redmond, USA). Os pressupostos como a normalidade e homocedasticidade foram testados pelos testes de Shapiro–Wilk's e Levene's, respectivamente. As variáveis paramétricas (dados morfológicos, índices morfométricos, características do sêmen e plasma, concentrações hormonais e características espermáticas, exceto classe de motilidade espermática e morfologia espermática) foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguido de Tukey HSD ou teste t de Student pareado. Já para as variáveis não paramétricas (classe de motilidade espermática e morfologia espermática) foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal–Wallis. Todos os testes foram realizados com o nível de significância de $\alpha=0,05$, sendo expressados como média±EP.

Resultados

Dados morfológicos, seminais e espermáticos

Os valores médios dos dados morfológicos e índices morfométricos estão representados na Tabela 1. Os valores médios das variáveis CP, PT, K, IGS, IVS e IHS foram similares entre os grupos ($p>0,05$). Todos os animais hormonalmente induzidos neste estudo, inclusive os reespermados, responderam positivamente ao tratamento hormonal liberando alguma quantidade de sêmen.

As médias de cada grupo e as diferenças estatísticas entre os valores das variáveis quali e quantitativas do sêmen e plasma seminal estão apresentadas na Tabela 2. Os valores médios da anomalia espermática, mobilidade, integridade do DNA, viabilidade espermática e proteína total do plasma seminal estão apresentados na Fig. 1.

O VE ($3,58 \pm 0,48$ mL) do início da estação reprodutiva foi inferior ao do final ($7,75 \pm 1,29$ mL) (Tabela 2). O VE, DE e PE dos animais reespermados foram similares aos dos outros grupos, inclusive com relação ao grupo que foi espermado pela primeira vez na mesma data (coleta intermediária). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) para DE, PS, íons do plasma seminal (Ca^{+2} , Na^+ , K^+ , Mg^{+2} e Cl^-), osmolaridade e pH (Tabela 2).

Com relação às características dos espermatozoides (Fig. 1), no grupo espermado no final da estação encontramos valores reduzidos de taxa de motilidade, duração de motilidade e viabilidade espermática, bem como taxas superiores de anomalias espermáticas em relação a todos os outros grupos ($p<0,05$). A proteína total do plasma seminal e o índice de danos do DNA aumentaram gradativamente ao longo do período investigado ($p<0,05$). Porém, observamos no grupo reespermado valores médios similares aos do início da estação, com taxas reduzidas de índice de danos de DNA e proteína no plasma quando comparadas com os valores dos outros animais espermados pela primeira vez, no mesmo período de coleta ($p>0,05$).

Histologia, hormônios esteroides e expressão gênica

Os testículos amostrados no meio da estação reprodutiva (21/12/2010) foram classificados dentro dos seguintes estágios (com as respectivas frequências em parênteses): IV-V (8%), V-VI (84%) e VI-VII (8%) (Fig. 2). No final do período reprodutivo encontramos peixes com testículos classificados nos estágios: V-VI e VI-VII (92 e 8%), indicando avanço no processo de regressão. No grupo dos reespermados foram observados testículos apenas nos estágios IV-V e V-VI (50 e 50%).

Os níveis plasmáticos de 17α -OHP ($p > 0,05$) foram similares entre os grupos antes e após o tratamento hormonal. Nenhum grupo apresentou elevação significativa nas concentrações plasmáticas de 17α -OHP ($p > 0,05$) após o tratamento hormonal.

Conforme demonstrado na Fig. 3, a concentração plasmática média de E_2 no final de estação reprodutiva (antes do tratamento hormonal) ($0,208 \pm 0,059$ ng/mL, $p < 0,05$) foi inferior aos demais grupos. Os valores médios de E_2 foram similares entre os grupos após a indução hormonal. Elevações significativas nas concentrações médias ($p < 0,05$) de E_2 dentro de cada grupo, em virtude do tratamento hormonal, só foram detectadas no início da estação (de $0,688 \pm 0,170$ ng/mL para $0,963 \pm 0,191$ ng/mL) e no grupo dos machos reespermados (de $0,429 \pm 0,188$ ng/mL para $0,853 \pm 0,150$ ng/mL) (Fig. 3)

A concentração plasmática de T antes da indução hormonal foi inferior ($0,063 \pm 0,001$ ng/mL, $p < 0,05$) no final de estação reprodutiva (Fig. 3). Os valores foram similares entre os grupos após a indução hormonal. Elevações significativas ($p < 0,05$) nas concentrações de T durante o tratamento hormonal foram detectadas no final da estação reprodutiva (de $0,063 \pm 0,001$ ng/mL para $1,310 \pm 0,285$ ng/mL) e no grupo reespermado (de $0,488 \pm 0,384$ ng/mL para $2,834 \pm 0,388$ ng/mL). Os valores de 11-KT foram similares entre os grupos antes do tratamento hormonal ($p < 0,05$). Após o tratamento hormonal, os valores médios de 11KT dos grupos do início da estação reprodutiva e reespermado foram superiores ($p < 0,05$) aos demais grupos.

Entre os esteroides analisados, as diferenças mais pronunciadas observadas durante o tratamento hormonal foram àquelas relativas às elevações nas concentrações plasmáticas de 11KT. No início da estação reprodutiva e no

grupo reespermado, os valores aumentaram $\cong 23$ vezes (de $0,194 \pm 0,050$ ng/mL para $4,431 \pm 0,713$ ng/mL) e $\cong 27$ vezes o nível basal (de $0,165 \pm 0,036$ ng/mL para $4,448 \pm 0,667$ ng/mL), respectivamente.

A expressão do gene *fshb* foi similar ($p > 0,05$) entre os grupos (Fig. 4). Os perfis das expressões de *lhb* e *gh* foram similares, ou seja, os valores médios do grupo analisado ao final da estação reprodutiva foram superiores ao grupo dos reespermados ($p < 0,05$). Os valores médios do grupo analisado no meio da estação foram similares aos demais grupos ($p > 0,05$).

Discussão

As características do sêmen e dos espermatozoides de pacu foram avaliados ao longo do período de desova, por meio de diversos parâmetros, tais como: volume de ejaculado, motilidade, duração da motilidade, viabilidade espermática, morfologia do esperma, proteína total do plasma seminal e índice de danos do DNA. Observamos que, a não ser por um aumento na concentração da proteína do plasma, as características analisadas do sêmen (concentração em íons, osmolaridade e pH) foram constantes. Em contrapartida, observamos uma pronunciada redução na qualidade dos espermatozoides do começo para o fim da época de desova. Os espermatozoides de melhor qualidade, considerando todos os aspectos, foram observados nos grupos do início da época de desova (17/11/2010) e reespermados, sugerindo fortemente que o envelhecimento celular pode estar relacionado com a queda na qualidade dos mesmos.

O pacu é sabidamente uma das espécies que exige maior experiência do produtor, principalmente no que diz respeito a obtenção de ovulação bem sucedida, onde concentra-se a maior parte dos problemas, estudos e conhecimento [34,35]. Por outro lado, os machos não apresentam dificuldade para liberar quantidades satisfatórias de sêmen que é utilizado indiscriminadamente, sem critério de seleção. Normalmente, quando ocorrem problemas com a qualidade de embriões e larvas as causas são atribuídas às fêmeas e aos seus ovócitos. Neste contexto, os resultados obtidos neste trabalho mostram uma redução na qualidade dos espermatozoides de pacu ao longo da estação de desova e que estes devem ser evitados no final da época reprodutiva.

Diversos trabalhos mostram que espermatozoides de má qualidade interferem diretamente no sucesso da fertilização dos ovócitos, gerando embriões de má qualidade [14, 36-39]. Assim, produtores de pacu podem estar fazendo uso de sêmen de qualidade inferior, uma vez que o único critério usado rotineiramente em pisciculturas é liberar ou não liberar sêmen. E mais agravante ainda, os machos que liberam maior volume de sêmen são preferidos em relação àqueles que liberam volume reduzido. Neste sentido, considerando a qualidade do sêmen, nossos resultados apontam que a melhor estratégia para esta espécie seria induzir a reprodução da espécie no início do período reprodutivo. Desta forma, mesmo que um volume menor de sêmen espermado fosse obtido, este provavelmente teria uma qualidade espermática superior, por propiciar sêmen com maior número de células viáveis.

Estudos sobre a qualidade do sêmen demonstraram que o conteúdo em íons, a osmolaridade e o pH podem ser correlacionados com a motilidade (para revisão: [40]), no entanto, no presente estudo os primeiros mantiveram-se estáveis e o último reduzido ao final da estação reprodutiva. Os valores médios de motilidade e tempo de motilidade do grupo analisado no início da estação reprodutiva foram superiores aos do grupo analisado no final. Estas diferenças podem também estar relacionadas ao “envelhecimento” dos espermatozoides, sendo relatadas reduções na motilidade e tempo de motilidade do início para o final da estação reprodutiva em outras espécies [41].

No nosso estudo, verificamos uma associação entre danos de DNA, anomalias morfológicas dos espermatozoides e alterações nas proteínas do plasma seminal. É sabido que danos no DNA [42] correlacionam-se com anomalias morfológicas em espermatozoides [43, 44]. Além disso, é sabido que podem existir relações de proteínas do plasma seminal com qualidade do sêmen [45-49]. No entanto, infelizmente, não existem ainda métodos rápidos que permitam verificar estas características à campo e evitar o uso deste tipo de sêmen, o que seria de grande valia para esta e outras espécies de peixes.

No pacu, as expressões de *lhb* e *gh* foram induzidas no final da estação reprodutiva. De forma similar em *Oncorhynchus mykiss* as expressões de *lhb*, *gh* foram superiores ao término do processo reprodutivo [50], e de acordo com estes autores esta elevação se associa com uma elevação de Lh durante o final da época reprodutiva. Paralelamente, já foi demonstrado em machos de bagre

africano (*Clarias gariepinus*) que o tratamento com GnRH é capaz de estimular o aumento da concentração de Lh no plasma, mas não do Gh [51]. Sabe-se também que o efeito indutor do GnRH sobre a síntese e liberação do Gh é mais intenso nas fases finais da maturação testicular [50]. Numa análise conjunta, é possível sugerir que as elevações das expressões do *lhb* e *gh* no pacu, no final da estação reprodutiva, estão relacionadas com a fase final da maturação gonadal e a uma possível ação do GnRH, mas não com a qualidade do sêmen propriamente dita.

As concentrações de 17 α -OHP não se correlacionaram com os resultados encontrados, pois permaneceram estáveis ao longo da estação de desova e antes e após as induções hormonais. A 17 α -OHP é o principal hormônio relacionado com a produção da 17-alfa-20-beta-dihidroprogesterona (principal substância envolvida com a ovulação) [52] e que, em machos, pode aumentar o volume seminal [67]. No entanto, não observamos uma associação clara entre as concentrações plasmáticas de 17 α -OHP com quaisquer dos parâmetros estudados nos pacus machos.

Os grupos que apresentaram sêmen de melhor qualidade (início de estação e reespermado) foram também aqueles que apresentaram elevação significativa de 11-KT ($p < 0,05$) durante a indução hormonal. A 11 KT é o andrógeno mais potente em peixes [52] e tem papel chave no processo de espermição [53,54]. Neste estudo, observamos que a elevação de 11-KT parece estar relacionada com obtenção de sêmen de boa qualidade no pacu. Por outro lado, com relação às variações das concentrações plasmáticas da T durante a indução hormonal, diferenças só foram encontradas em animais reespermados e no final da estação de desova, portanto não se relacionando com a obtenção de sêmen de qualidade superior.

Observamos redução na concentração plasmática de T e E₂, no final da estação reprodutiva, quando comparado aos demais períodos. Perfil semelhante a este também foi encontrado em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). O E₂ tem função ainda pouco conhecida nos teleosteos machos, mas pode estar associado à proliferação de células germinativas imaturas [21], o que poderia explicar a redução gradativa de sua concentração no pacu à medida que o processo de regressão se aproximava. Raciocínio similar pode ser desenvolvido para a testosterona [21], que tem papel na espermatogênese e na produção de estradiol.

Portanto, a queda nas concentrações registradas para ambos esteroides marcaram o final do período de espermição do pacu.

Pelo fato dos espermatozoides começarem a ser produzidos muitos meses antes de serem liberados e levarem poucos dias para serem formados [21], é possível que espermatozoides “envelhecidos” possam muitas vezes ser os responsáveis por baixas taxas de fertilidade em desovas, nesta e outras espécies. Neste contexto, a reespermição surge como excelente ferramenta que permite uma renovação e coleta de espermatozoides recém-produzidos. Os animais reespermiados permaneceram em maturação, mesmo após 30 dias da primeira espermição, indicando que esta ferramenta não induziu esgotamento, regressão ou repouso nestes indivíduos. Neste contexto, é possível que o GnRHa aplicado para indução hormonal possa ter atuado sobre os pacus reespermiados, à semelhança do reportado para o *Dicentrarchus labrax* tratados com GnRHa onde se observou aumento de ejaculado e prolongamento da espermição [56]. Assim, o envolvimento da estimulação hormonal à espermição e reespermição do pacu, precisa ser explorado em futuros trabalhos.

Com relação ao intervalo entre a espermição e reespermição, no bagre africano e em salmonídeos, recomenda-se 90 e 7 dias, respectivamente [57,58]. No pacu, o tempo de 35 dias após primeira coleta de sêmen permitiu a recuperação dos testículos, e a produção de volume similar ao obtido em animais espermiados pela primeira vez. Dadas as diferenças existentes entre as características do processo espermatogênico entre as espécies de teleósteos, como necessidade de ablação no bagre africano [59], é possível que a espermição exija um estudo de caso específico para cada espécie.

A qualidade do sêmen e dos espermatozoides de pacu é reduzida gradativamente ao longo estação reprodutiva. A indução hormonal deve ser realizada tão logo as fêmeas estiverem aptas, no início da estação, quando o sêmen é de qualidade superior. Observamos que a reespermição é viável e representando também uma interessante alternativa para manter a qualidade de sêmen do pacu ao longo da estação reprodutiva, inclusive permitindo que o sêmen possa ser criopreservado para uso posterior. Ademais, observamos, ainda, que a primeira coleta de sêmen para reespermição deve ser realizada o quanto antes dentro do período de desova, pois propiciará sêmen de excelente qualidade e tempo suficiente para uma segunda coleta.

Agradecimentos

Agradecemos pelas condições e estruturas fornecidas o Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura (CAUNESP) da UNESP (Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV)). Agradecemos ao Dr. Jeffrey Frederico Lui do (Departamento de Zootecnia – FVAV), a Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi e Dra. Marcia Rita Fernandes Machado (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal –FCAV), ao Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves (Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária – FCAV) a ao Dr. José Jurandir Fagliari (Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV). Assim como os alunos e técnicos destes locais citados, por terem oferecido suporte e uso de seus laboratórios.

Referências bibliográficas

- [1] Zaniboni – Filho E, Weingart M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. Rev. Bras Reprod Anim 2007; 31: 367-373.
- [2] Lima RVA, Bernardino G, Val-Sella MV, Fava-de-Moraes F, Schemy RA, Borella MI. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos e cativoiro. Bol. Téc. CEPTA 1191; 4: 1-46.
- [3] Wang Z, Crim LW. Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus*. Fish Physiol Biochem 1997; 16: 77-83.
- [4] Mylonas CC, Papadaki M, Divanach P. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). Aquac Res 2003; 34: 1161-1170.
- [5] Babiak I, Ottesen O, Rudolfson G, Johnsen S. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. Theriogenology 2006; 65: 1587-1604.
- [6] Cabrita E, Soares F, Dinis, MT. Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. Aquaculture 2006; 261: 967-975.
- [7] Sahinöz E, Aral F, Dogu Z. Changes in Mesopotamian spiny eel, *Mastacembelus mastacembelus* (Bank & Solender in Russell, 1794) (Mastacembelidae) milt quality during a spawning period. Theriogenology 2007; 67: 848-854.
- [8] Büyükhatipoglu S, Holtz W. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. Aquaculture 1984; 37: 63-71.
- [9] Kruger JCDeW, Smit GL, Van Vuren JHJ, Ferreira JT. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus*. J Fish Biol 1984; 24: 263-272.

- [10] Koldras M, Loir M, Maise G, Le Gac F. Study of the composition of seminal fluid and of sperm motility along the genital tract, during a spawning season in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Living Resour* 1996; 9: 337–345.
- [11] Luz RK, Ferreira AA, Reynalte DAT, Zaniboni Filho E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (pimelodidae). *Bol Inst Pesca* 2001; 27: 39-42.
- [12] Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biol Int* 2006; 30: 1-14.
- [13] Nynca J, Kuźmiński H, Dietrich GJ, Hliwa P, Dobosz S, Liszewska E, Karol H, Ciereszko A. Changes in sperm parameters of sex-reversed female rainbow trout during spawning season in relation to sperm parameters of normal males. *Theriogenology* 2012; 77: 1381-1389.
- [14] Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165: 535–548.
- [15] Kjørsvik E, Mangor-Jensen A, Holmefjord I. Egg quality in fishes. *Adv Mar Biol* 1990; 26: 71–113.
- [16] Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 2004; 234: 1-28.
- [17] Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: a review. *Cell Bio Int* 2005; 29: 101-110.
- [18] Grier HJ, Taylor RG. Testicular maturation and regression in the common snook. *J Fish Biol* 1998; 53: 521-542.
- [19] Brown-Peterson NJ, Grier HJ, Overstreet RM. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *J Fish Biol* 2002; 60: 178-202.
- [20] Batlouni SR, Romagosa E, Borella MI. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium an approach addressed to aquaculture. *Anim Reprod Sci* 2006; 96: 116-132.
- [21] Nóbrega RH, Batlouni SR, França LR. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem* 2009; 35: 197-206.
- [22] DeSouza TG. Biologia reprodutiva e qualidade do sêmen de reprodutores de curimatá, *Prochilodus lineatus*, em condições distintas de manejo. Jaboticabal, BR: Centro de Aquicultura da Unesp; 2011. Dissertação.
- [23] Toshimori K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech*. 2003; 61:1-6.
- [24] Hajirezaee S, Amiri BM, Mirwaghefi A. Effects of stripping frequency on semen quality of endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*. *Am J Anim Vet Sci* 2009; 4: 65-71.
- [25] Heyrati FP, Amiri BM, Dorafshan S. Effect of GnRH α injection on milt volume in recently stripped rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac Res* 2010; 41: e487–e492.
- [26] Huertas M, Scott AP, Hubbard PC, Canario AVM, Cerdà J. Sexually mature European eels (*Anguilla anguilla* L.) stimulate gonadal development of neighbouring males: possible involvement of chemical communication. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 147: 304–313.

- [27] Utoh T, Okamura A, Yamada Y, Tanaka S, Mikawa N, Akazawa A, Horie N, Oka HP. Reproductive cycle in reared male common Japanese conger *Conger myriaster*. *Aquaculture* 2004; 240: 589–605.
- [28] Peñaranda DS, Pérez L, Gallego V, Jover M, Tveiten H, Baloché S, Dufour S, Asturiano JF. Molecular and physiological study of the artificial maturation process in European eel males: from brain to testis. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166: 160–171.
- [29] Bogerd J, Blomenrohr M, Andersson E, van der Putten HH, Tensen CP, Vischer HF, Granneman JC, Janssen-Dommerholt C, Goos HJ, Schulz RW. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*), *Biol Reprod* 2001; 64: 1633–1643.
- [30] Borges A, Siqueira DR, Jurinitz DF, Zanini R, Amaral F, Grillo ML, Oberst ER, Wassermann GF. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiol Biochem* 2005; 31: 45-53.
- [31] Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Carneiro PC. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*, *Zygote* 2012; 20: 39–43.
- [32] Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2005; 50: 144-153.
- [33] Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008; 23: 143-151.
- [34] Romagosa E, Godinho HM, Braga FM. Mudanças morfológicas dos ovários de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. *Bol Inst Pesca* 1993; 20: 67-80.
- [35] Criscuolo-Urbinati E, Kuradomi RY, Urbinati EC, Batlouni, SR. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology* 2012; 78: 2087-2094.
- [36] Campbell PM, Pottinger TG, Sumpter JP. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol Reprod* 1992; 47: 1140–1150.
- [37] Campbell PM, Pottinger TG, Sumpter JP. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture* 1994; 120: 151–169.
- [38] Wu RS, Zhou BS, Randall DJ, Woo NY, Lam PK. Aquatic hypoxia is an disrupter and impairs fish reproduction. *Environ Sci Technol* 2003; 7: 1137-1141.
- [39] DeSouza TG. Biologia reprodutiva e qualidade do sêmen de reprodutores de curimatá, *Prochilodus lineatus*, em condições distintas de manejo. Jaboticabal, BR: Centro de Aquicultura da Unesp; 2011. Dissertação.
- [40] Cosson J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *J Fish Biol* 2010; 76: 240-279.
- [41] Suquet M, Dreanno C, Dorange G, Normant Y, Quemener L, Gaignon JL, Billard R. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. *J Fish Biol* 1998; 52: 31-41.
- [42] Enciso M, Cisale H, Johnston SD, Sarasa J, Fernández, JL, Gosálveza J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology* 2011, 76: 23–32.

- [43] Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 11003.
- [44] Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995; 64: 868–870.
- [45] Cecchini S, Caputo AR. Seminal plasma of brown trout, *Salmo trutta fario* (L.) contains a factor able to retain iron at acid pH, typical feature of lactoferrin. *Fish Shellfish Immunol* 2010; 28: 927–930.
- [46] Butts IA, Trippel EA, Ciereszko A, Soler C, Słowińska M, Alavi SM, Litvak MK, Babiak I. Seminal plasma biochemistry and spermatozoa characteristics of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) of wild and cultivated origin. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2011; 159: 16–24.
- [47] Lahnsteiner F, Mansour N, Berger B. Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 62: 801–808.
- [48] Lahnsteiner F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 2007; 69: 384–396.
- [49] Li P, Hulak M, Linhart O. Sperm proteins in teleostean and chondrosteian (sturgeon) fishes. *Fish Physiol Biochem* 2009; 35: 567–581.
- [50] Gomez JM, Weil C, Ollitrault M, LeBail PY, Breton B, LeGac F. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 1999; 113: 413–428.
- [51] Bosma PT, Kolk SM, Rebers FE, Lescroart O, Roelants I, Willems PH, Schulz RW. Gonadotrophs but not somatotrophs carry gonadotrophin-releasing hormone receptors: receptor localisation, intracellular calcium, and gonadotrophin and GH release. *J Endocrinol* 1997; 152: 437–446.
- [52] Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop Growth Differ* 2008; 50: S195–S219.
- [53] Schulz RW, França LR, Lareyre J, LeGac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165: 390–411.
- [54] Dabrowski K, Rinchard J, Ottobre JS, Alcantara F, Padilla P, Ciereszko A, DeJesus MJ, Kohler CC. (2003), Effect of Oxygen Saturation in Water on Reproductive Performances of Pacu *Piaractus brachypomus*. *J World Aquacult Soc* 2003; 34: 441–449.
- [55] Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165: 516–534.
- [56] Sorbera LA, Mylonas CC, Zanuy S, Carrillo M, Zohar Y. Sustained administration of GnRH increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Exp Zool* 1996; 276: 361–368.
- [57] Hajirezaee S, Amiri BM, Mirwaghefi A. Effects of stripping frequency on semen quality of endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*. *Am J Anim Vet Sci* 2009; 4: 65–71.
- [58] Heyrati FP, Amiri BM, Dorafshan S. Effect of GnRHa injection on milt volume in recently stripped rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac Res* 2010; 41: e487–e492.
- [59] Diyaware MY, Haruna AB, Abubakar KA. Determination of Testes Regeneration Period for African Catfish (*Clarias anguillaris*) after Milt (Semen) Collection Through Ablation. *Curr Res J Biol Sci* 2010, 2: 375–379.

- [60] Planas JV, Swanson P. Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GTH I and GTH II) in vitro. *Biol Reprod* 1995, 52:697–704.
- [61] García-López A, Bogerd J, Granneman JC, van Dijk W, Trant JM, Taranger GL, Schulz RW. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology* 2009, 150:357–365.
- [62] Weltzien FA, Nórberga B, Swanson P. Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Gen Comp Endocrinol* 2003, 131:97–105.
- [63] Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K, Pasqualini C. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *J Fish Biol* 2010, 76: 129-160.
- [64] García-López A, de Jonge H, Nóbrega RH, de Waal PP, van Dijk W, Hemrika W, Taranger GL, Bogerd J, Schulz RW. Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. *Endocrinology* 2010, 151:2349–2360.
- [65] Miura C, Miura T, Kudo N, Yamashita M, Yamauchi K. cDNA cloning of a stage specific gene expressed during HCG-induced spermatogenesis in the Japanese eel. *Dev Growth Differ* 1999, 41: 463–471.
- [66] Miura T, Miura C. Japanese eel: a model for analysis of spermatogenesis. *Zoo Sci* 2001, 18: 1055–1063.
- [67] Scott AP, Sumpter JP, Stacey N. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *J Fish Biol* 2010, 76:183-224.
- [68] Canosa LF, Chang JP, Peter RE. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Gen. Comp. Endocrinol* 2007 151: 1–26.
- [69] Sumpter JP, Lincoln RF, Bye VJ, Carragher JF, Le Bail PY. Plasma growth hormone levels during sexual maturation in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 1991, 83:103–110.
- [70] Björnsson BT. The biology of salmon growth hormone daylight to dominance. *Fish Physiol Biochem* 1997, 17:9–24.
- [71] Bhandari RK, Taniyama S, Kitahashi T, Ando H, Yamauchi K, Zohar Y, Ueda H, Urano A. Seasonal changes of responses to gonadotropin-releasing hormone analog in expression of growth hormone/prolactin/somatolactin genes in the pituitary of masu salmon. *Gen Comp Endocrinol* 2003, 130:55-63.
- [72] Wong AO, Zhou H, Jiang Y, Ko WK. Feedback regulation of growth hormone synthesis and secretion in fish and the emerging concept of intrapituitary feedback loop. *Comp Biochem Physiol* 2006, 144:284–305.

Tabela 1 – Morfologia e índices morfométricos (média±EP) de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ao longo do período reprodutivo, início (17/11/2010), meio (21/12/2010), final (12/02/2012) e reespermiado (21/12/2010). Comprimento padrão (CP), massa total (W_T), fator de condição (K), índice gonadossomático (IGS), índice vicerossomático (IVS) e índice hepatossomático (IHS).

	<i>coletas</i>			
	<i>início</i>	<i>meio</i>	<i>final</i>	<i>reespermiado</i>
CP	41,33±0,72 ^a	41,06±1,06 ^a	44,07±1,42 ^a	38,42±0,98 ^a
W_T	2,10±0,07 ^a	2,38±0,22 ^a	2,54±0,21 ^a	1,87±0,10 ^a
K	2,09±0,13 ^a	2,48±0,18 ^a	2,44±0,32 ^a	2,29±0,09 ^a
IGS	—	0,76±0,25 ^a	0,80±0,14 ^a	0,84±0,17 ^a
IVS	—	5,84±0,64 ^a	5,91±0,24 ^a	5,54±0,33 ^a
IHS	—	0,80±0,06 ^a	0,64±0,03 ^a	0,92±0,10 ^a
n	7	5	4	4

Letras sobrescritas representam diferenças significativas entre as amostras, para cada variável (p<0,05).

Tabela 2 Características e composições do sêmen e plasma (média±EP) de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ao longo do período reprodutivo e reespermado. Volume espermado (VE), densidade espermática (DE) e produção espermática (PE).

	<i>coletas</i>			
	<i>início</i>	<i>meio</i>	<i>final</i>	<i>reespermado</i>
VE	3,58±0,48 ^a	6,33±2,49 ^{ab}	7,75±1,29 ^b	6,00±0,54 ^{ab}
DE	6,76±1,58 ^a	6,94±0,34 ^a	4,74±0,29 ^a	5,42±0,26 ^a
PE	26,86±9,32 ^a	45,44±19,26 ^a	37,50±7,25 ^a	32,64±3,47 ^a
pH	8,05±0,10 ^a	8,29±0,02 ^a	8,27±0,02 ^a	8,17±0,03 ^a
Ca⁺²	0,65±0,02 ^a	0,70±0,03 ^a	0,66±0,03 ^a	0,71±0,02 ^a
Na⁺	93,83±2,69 ^a	97,00±3,51 ^a	92,50±3,20 ^a	95,25±1,49 ^a
K⁺	42,67±2,64 ^a	36,00±2,08 ^a	38,25±0,48 ^a	40,50±2,63 ^a
Mg⁺²	0,31±0,04 ^a	0,59±0,10 ^a	0,46±0,10 ^a	0,51±0,08 ^a
Cl⁻	118,42±3,69 ^a	115,20±1,02 ^a	110,98±3,89 ^a	124,25±3,62 ^a
osmolaridade	208,50±17,36 ^a	190,00±4,36 ^a	194,00±5,05 ^a	204,75±7,47 ^a
n	6	4	4	4

Letras sobrescritas representam diferenças significativas entre as amostras, para cada variável (p<0,05).

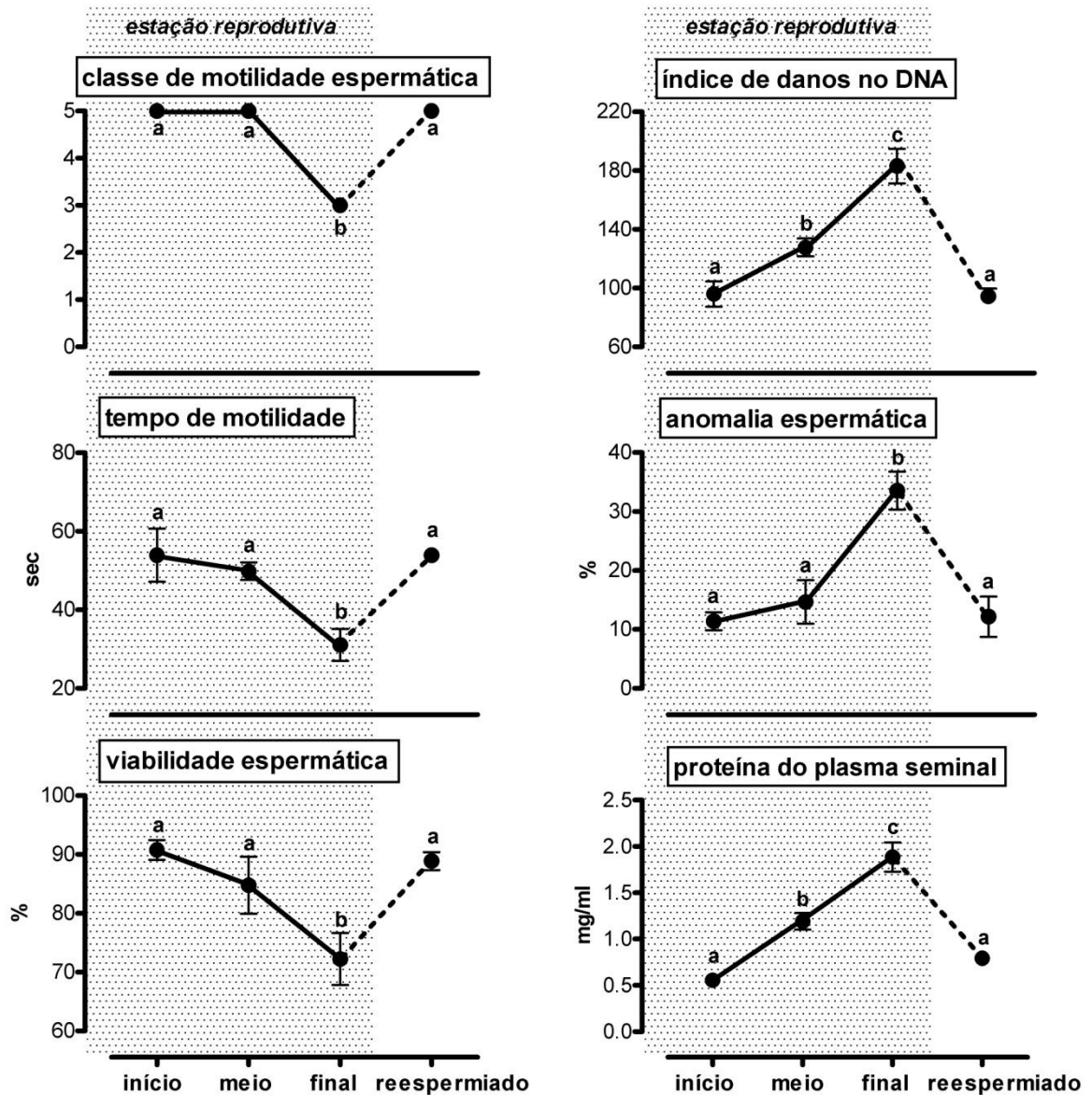


Fig. 1 – Características espermáticas, motilidade e proteína total do plasma seminal (média±EP) de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ao longo da estação reprodutiva e reespermiado. Letras diferentes representam diferenças entre as amostras para cada variável ($p < 0,05$).

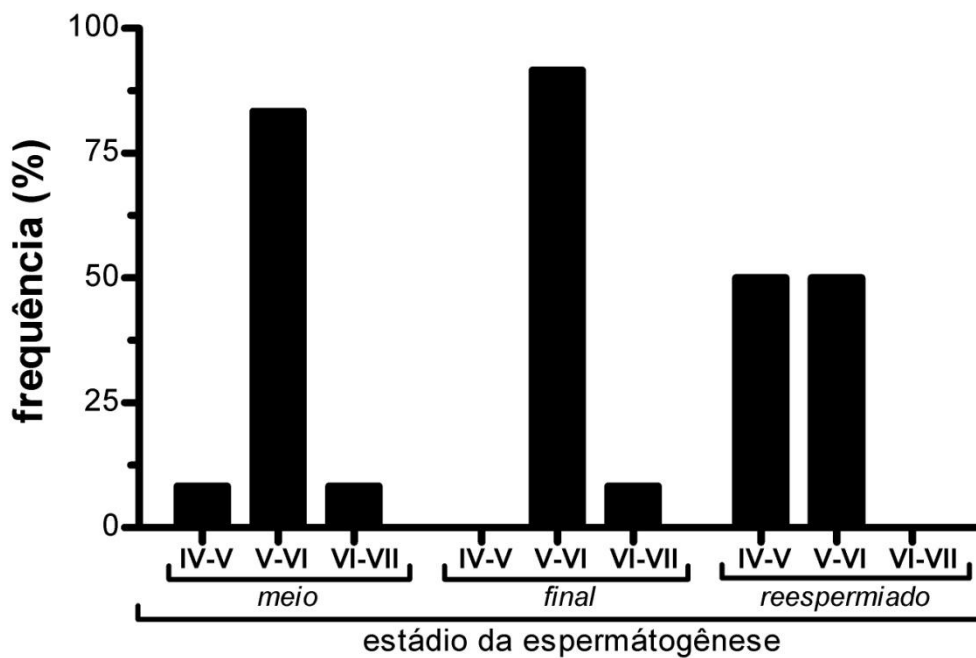


Fig. 2 – Frequência de testículos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) classificados de acordo com seu estágio da espermatogênese. Estágio IV – presença de espermatozoides; estágio V – aumento do número de espermatozoides maduros em relação ao estágio IV, enquanto os restantes das células germinativas estão em menor proporção; estágio VI – presença apenas de espermatozoides e algumas espermatogônias; estágio VII – quase todos os espermatozoides fagocitados pelas células de Sertoli, restando apenas as espermatogônias primárias e espermatozoides remanescentes nos túbulos.

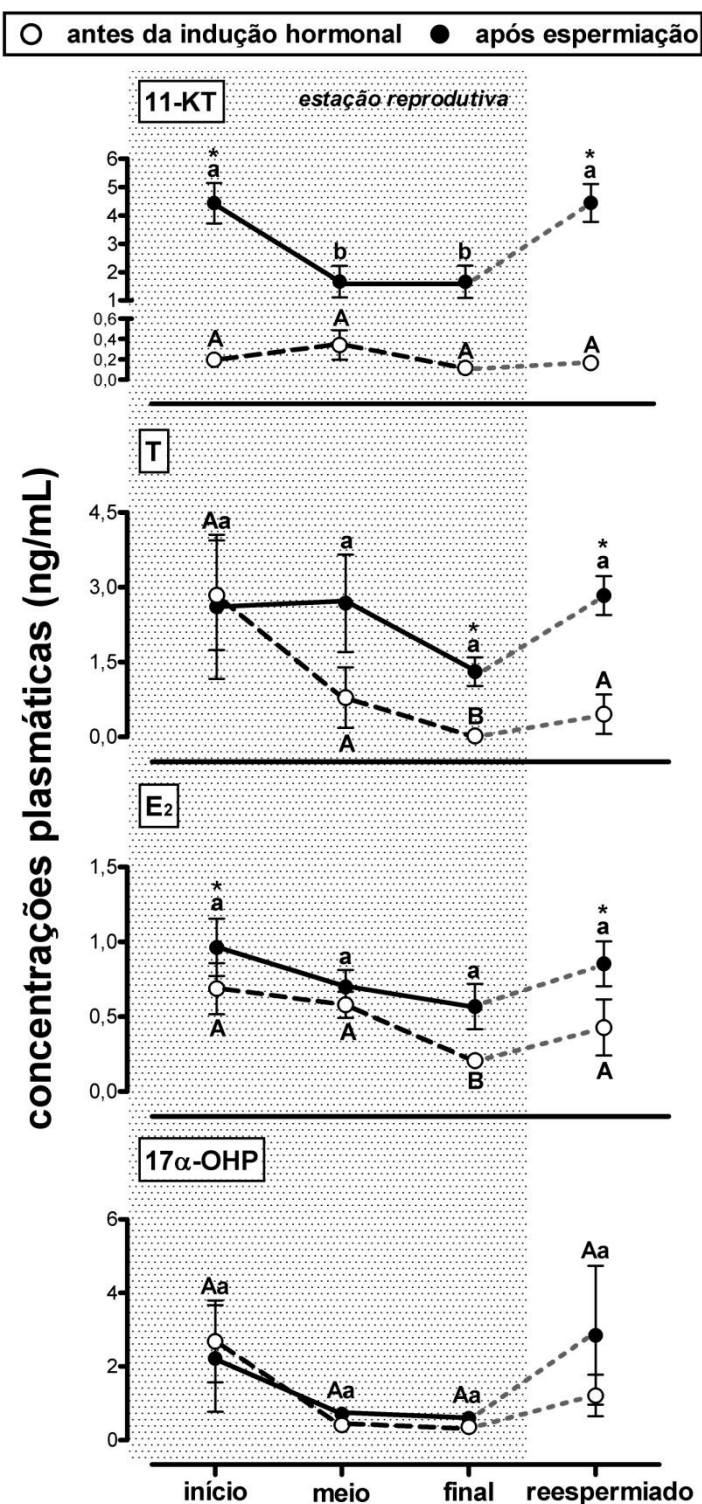


Fig. 3 – Níveis plasmáticos de 17α-hidroxiprogesterona (17α-OHP), 17β-estradiol (E₂), testosterona (T) and 11-cetotestosterona (11-KT) de machos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) durante a estação reprodutiva e reespermiado. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas (p<0,05) ao longo do tempo e reespermiado para “antes da indução hormonal”. Da mesma forma, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas (p<0,05) ao longo do tempo e reespermiado para “após espermição”. * - significa diferença (p<0,05) entre “antes da indução hormonal” e “após espermição” na mesma data e variável.

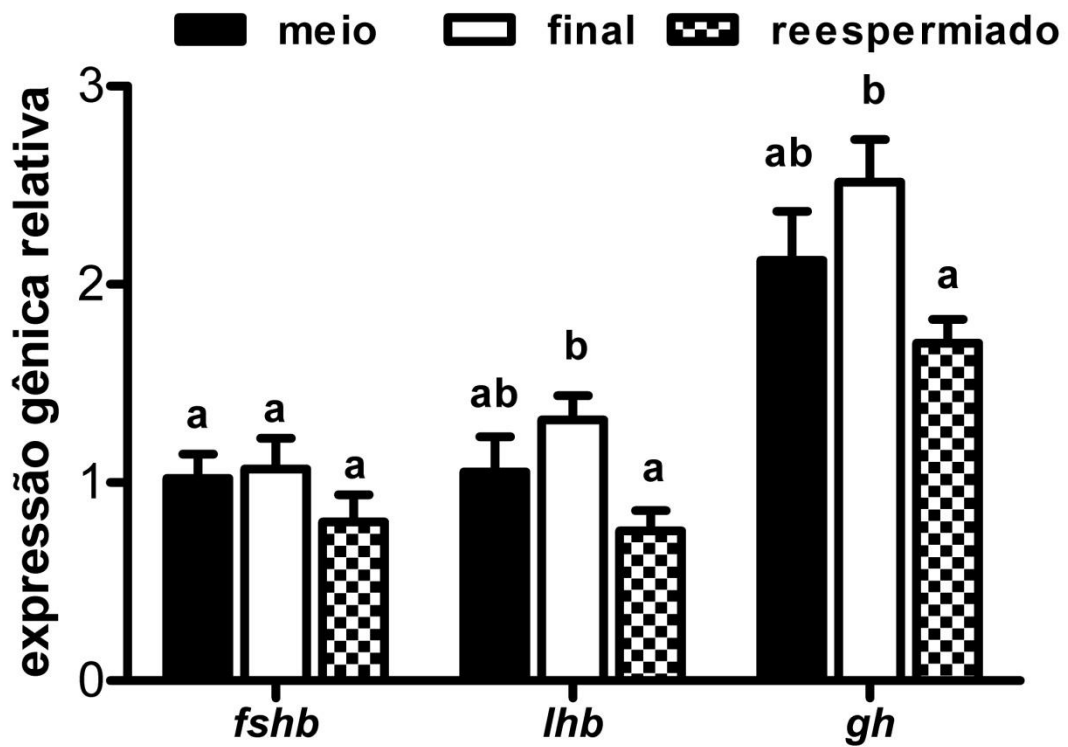


Fig. 4 –Expressão relativa dos genes *fshb*, *lhb* e *gh* hipofisário de pacu macho (*Piaractus mesopotamicus*) coletados após espermição, ao longo do período reprodutiva e reespermiado. Letras diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos investigados para o mesmo gene.

3. CONCLUSÕES GERAIS

No manuscrito I deste estudo observamos que aos 35 dias após a introdução do implante (dci) de liberação lenta de sGnRHa houve um aumento no número de fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*) aptas a indução hormonal. Neste mesmo manuscrito também foram sequenciados os genes do *fshb*, *lhb*, e *ef1a*. Em fêmeas de pacu o implante de sGnRHa teve um efeito indutor para o *lhb* e não para o *fshb* e *gh*.

Com os resultados obtidos no manuscrito II observamos que a qualidade do sêmen de pacu decaiu ao longo da estação reprodutiva, especialmente no que se diz respeito à qualidade do material genético dos espermatozoides, sugerindo fortemente que o envelhecimento celular pode estar relacionado com a queda na qualidade dos mesmos. Além disso, o volume espermiado foi superior no final da estação reprodutiva em relação ao início. Desta forma, deve-se evitar utilizar (para fertilizações) o sêmen de pacu no final da época reprodutiva. Contudo, como uma alternativa para evitar a redução na qualidade do sêmen, a “reespermição”, que consiste em espermiar mais de uma vez o mesmo macho durante a estação de desova, se mostrou muito eficiente, restaurando a qualidade do sêmen e dos espermatozoides.

Ainda no manuscrito II, com relação aos níveis de expressão gênica, mostramos que o *lhb* e *gh* estavam induzidos no grupo do final da estação reprodutiva em relação ao grupo reespermiado. Assim, aparentemente o pacu tem o perfil de expressão de *lhb* e *gh* associado com o estágio de maturação dos testículos e não com a qualidade do sêmen. Por outro lado, no pacu a obtenção de sêmen com características favoráveis se relacionou com elevações nas concentrações de 11-KT durante a indução hormonal, ocorrido no início da estação e nos animais reespermiados.

Analisando os resultados dos dois trabalhos podemos propor um manejo reprodutivo onde os machos poderiam ser espermiados no início da estação e o sêmen utilizado para diversas finalidades, como por exemplo, criopreservação para posterior uso. Concomitantemente, as fêmeas receberiam os implantes de sGnRHa no mesmo momento da primeira espermição dos machos. Assim tanto machos como fêmeas estariam teoricamente aptos para indução hormonal aos 35 dci, quando os machos seriam reespermiados.

4. REFÊRENCIAS COMPLEMENTARES

- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: a review. *Cell Bio Int.* 29, 101-110.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biol Int.* 30, 1-14.
- Alavi, H.S.M., Psenicka, M., Rodina, M., Pollicar, T., Linhart, O., 2008. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquat. Living Resour.* 21, 75–80.
- Almeida, F.F.L., Kristoffersen, C., Taranger, G.L., Schulz, R.W., 2008. Spermatogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel model of cystic germ cell development. *Biol Reprod.* 78, 27–34.
- Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., Rosenfeld, H., 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 212–221.
- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfsen, G., Johnsen, S., 2006. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology.* 65, 1587-1604.
- Barbaro, A., Franceson, A., Bertotto, D., Bozzato, G., DiMaria, I., Patarnello, P., Furlan, F., Colombo, L., 2002. More effective induction of spawning with long-acting GnRH agonist in the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. (Sciaenidae, Teleostei), a valuable candidate for Mediterranean mariculture. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 192–199.
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., Hoerstgen-Schwark, G., 2009. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 153: 30–38.
- Batlouni, S.R., Carreño, F.R., Romagosa, E., Borella, M.I., 2005. Cell junction in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatus* (Pisces, Siluriformes). *J Mol Hist.* 36, 97-110.
- Batlouni, S.R., Nóbrega, R.H., França, L.R., 2009. Cell junctions in fish seminiferous epithelium. *Fish Physiol Biochem.* 35, 207-217.
- Beirão, J., Cabrita, E., Soares, F., Herraes, M.P., Dinis, M.T., 2008. Cellular damage in spermatozoa from wild-captured *Solea senegalensis* as detected by two different assays: comet analysis and Annexin V-Fluorescein staining. *Journal of Applied Ichthyology.* 24, 508-513.

- Berlinsky, D.L., William, K., Hodson, R.G. and Sullivan, C.V., 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. J. World Aqua. Soc. 28, 79–86.
- Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. Aquaculture. 100, 263–298.
- Brasil, D.F., 2001. Análise Estrutural e ultraestrutural da maturação final do ovócito, fertilização e primeira clivagem em curimatá, *Prochilodus lineatus Valenciennes, 1836*. Tese apresentada ao Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista - CAUNESP, no Curso de Aqüicultura, área de concentração em Aqüicultura, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor. Jaboticabal –SP .
- Breton, B., Weil, C., Sambroni, E., Zohar, Y., 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRHa on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 91, 371–383.
- Britski, H.A.; Silimon, K.Z.S.; Lopes, B.S. 2007. Peixes do Pantanal: Manual de Identificação. Embrapa, Serviço de Produção de Informação, Brasília. 227p.
- Brzuska, E., Bialowas, H., 2002. Artificial spawning of carp, *Cyprinus carpio* (L.). Aquat. Res. 33, 753–765.
- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. Gen Comp Endocrinol. 165, 535–548.
- Bock, C.L., Padovani, C.R., 2000. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. Acta sci., Biol. sci.. 22, 495-501.
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg?. Rev Fish Biol Fisher. 7, 387-416.
- Burns, J.R., Quagio-Grassioto, I.; Jamieson, B.G.M., 2009. Ultrastructure of Spermatozoa: Ostariophysii. In: B.G.M. Jamieson. (Org.). Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Neoteleostomi). 1 eded. New Hampshire: Science Publishers, 2009, v. 8A, p. 287-387.
- Büyükhaticoglu, S., Holtz, W., 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. Aquaculture. 37, 63-71.
- Cabrita, E., Soares, F., Dinis, M.T., 2006. Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. Aquaculture. 261, 967-975.
- Campbell, B., Dickey, J., Beckman, B., Young, G., Pierce, A., Fukada, H., Swanson, P., 2006. Previtellogenic oocyte growth in salmon: relationships

- among body growth, plasma insulin-like growth factor-1, estradiol-17 β , follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-like growth factors, steroidogenic-acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone, and somatolactin. *Biol Reprod.* 75, 34–44.
- Carolsfeld, J., Ramos, S. M., Ormanezi, R., Gomes, J. H., Barbosa, J. M., Harvey, B., 1988a. Analysis of Protocols for Application of LHRH Analog for Induced Final Maturation and Ovulation of Female Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887). *Aquaculture.* 74, 49–55.
- Carolsfeld, J., Sherwood, N.M., Kriebeg, H., Sower, S.A. 1988b. Induced sexual maturation of herring using GnRH 'quick release' cholesterol pellets. *Aquaculture.* 70: 169-181.
- Carral, J.M., Rodriguez, R., Celafda, J.D., Saez-Royuela, A., Aguilera, A., Melendre, P., 2003. Successful gonadal development and maturation of tench (*Tinca tinca* L.) in small concrete ponds. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 130–131.
- Ceccarelli PS, Senhorini JA, Volpato G., 2000, Dicas em piscicultura - perguntas e respostas. Botucatu: Ed. Santana, 247p.
- Chang, C.F., Yueh, W.S., Lee, M.F., Schally, A.V., 1995. A microencapsulated analog of LH-RH accelerates maturation but without stimulating sex reversal in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Reprod. Nutr. Develop.* 35, 339–349.
- Chang, J.P., Wong, A.O.L., 2009. Growth Hormone Regulation in Fish: A Multifactorial Model with Hypothalamic, Peripheral and Local Autocrine/Paracrine Signals, In: Bernier, N.J., Van Der Kraak, G., Farrell, A.P., Brauner, C.J., (Eds), *Fish Physiology*, Vol. 28, Academic Press, Burlington, Vermont, pp. 151-195.
- Costa, R.M.R., Mateus, L.A.F., 2009. Reproductive biology of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Teleostei: Characidae) in the Cuiabá River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Neotrop ichthyol.* 7, 447-458.
- Crim, L.W., Sherwood, N.M., Wilson, C.E., 1988. Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture* 74, 87–95.
- Criscuolo-Urbinati E., Kuradomi R.Y., Urbinati, E.C., Batlouni, S.R., 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology*, 78, 2087-2094.
- Cyr, D.G., Eales, J.G., 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 6, 165–200.

- Dabrowski, K., Ciereszko, A., Ramseyer, L., Culver, D., Kestemont, P., 1994. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture*. 120, 171–180.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364.
- Dufour, S., Sebert, M.E., Weltzien, F.A., Rousseau, K., Pasqualini, C. 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *J Fish Biol.* 76, 129-160.
- Dumont-Neto, R., Pelli, A., Freitas, R.O., 1997. Reprodução induzida do dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849) na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta- Grande. *Revista Unimar*, 19, 439-445.
- Duncan, N.J., Rodriguez M. de O., G.A., Alok, D., Zohar, Y., 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture* 218, 625–635.
- Ferraz de Lima, J.A.; Barbieri, G.; Verani, J.R. 1984. Período de reprodução e idade a primeira maturação gonadal de pacu (*Colossoma mitrei*) em ambiente natural, (Rio Cuiabá, - Pantanal de Mato Grosso). *Anais do III Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*, São Carlos, SP.
- Food and Agricultural Organization The State of World Fisheries and Aquaculture 2012 (Food and Agricultural Organization, Rome, 2012).
- Forniés, M.A., Mañanos, E., Carrillo, M., Rocha, A., Laureau, S., Mylonas, C.C., Zohar, Y., Zanuy, S., 2001. Spawning induction of individualised European seabass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture*. 202, 221–223.
- Gabillard, J.C., Yao, K., Vandeputte, M., Gutierrez, J., Le Bail, P.Y., 2006. Differential expression of two GH receptor mRNA following temperature change in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *J Endocrinol.* 190, 29–37.
- Gardes, L., Villanove, P., Buchet, V., Fauvel, C., 2000. Induced spawning of red drum, *Sciaenops ocellatus*: use of multivariate and univariate analysis methods in the search for side effects of LHRHa treatments and ovarian development state upon spawn quality. *Aquat. Living Resour.* 13, 19–27.
- Gelman A., Drabkin V., Sachs O., Chechic K., Gabay I., Glatman L., 2004. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a new fish species in israeli aquaculture: possibility of utilization. *More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products.* 75-83.
- Godinho, H. P., Godinho, A. L., 1986. Induced Spawning of the Pacu, *Colossoma mitrei* (Berg 1895) by Hypophysation with Crude Carp Pituitary Extract. *Aquaculture*. 55, 69-73.

- Godinho, H.P., 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicada à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev Bras Rep Anim.* 31, 351-360.
- Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., Le Gac, F., 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 113, 413-428.
- Grier, H.J., 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am. Zool.* 21, 345–357.
- Grier, H.J., 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russell, L.D., Griswold, M.D. (Eds.), *The Sertoli cell*. Cache River Press, Clearwater, pp. 703–739.
- Grier, H.J., Taylor, R.G., 1998. Testicular maturation and regression in common snook. *J Fish Biol.* 53, 521–542.
- Grier, H.J. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J Morphol.* 243, 265-281.
- Guraya SS. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. 18: P 1- 233 in Sauer HW, editor. *Monographs in Developmental Biology*. New York, Karger.
- Guerrero, H. Y., Cardillo E., Poleo, G., Marcano, D., 2009. Reproductive biology of freshwater fishes from the Venezuelan floodplains. *Fish Physiol Biochem.* 35, 189–196.
- Harmin, S.A., Crim, L.W. and Wiegand, M.D., 1995. Manipulation of the seasonal reproductive cycle in winter flounder, *Pleuronectes americanus*, using a gonadotropic hormone-releasing hormone. *Mar. Biol.* 121, 611–619.
- Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod Nutr Dev.* 45, 261–279.
- Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Unuma, T., Nomura, K., 2005. The first success of glass eel production in the world: basic biology on fish reproduction advances new applied technology in aquaculture. *Fish Physiol Biochem.* 31, 193–199.
- Kayaba, T., Takeda, N., Yamauchi, K., 2001. Ultrastructure of the oocytes of the Japanese eel *Anguilla japonica* during artificially induced sexual maturation. *Fish Sci.* 67,870-879.
- Kjorsvik, E., Mangor—Jensen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes. In: Blaxter, J.H.S., Southward, A.J. (Eds.). *Adv. Mar. Biol.*, 26: 71-113.

- Koldras, M., Loir, M., Maise, G., Le Gac, F., 1996. Study of the composition of seminal fluid and of sperm motility along the genital tract, during a spawning season in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Living Resour.* 9, 337–345.
- Koulisch, S., Kramer, C.R., Grier, H.J., 2002. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J Morphol.* 254, 292-311.
- Kruger, J.C., De, W., Smit, G.L., Van Vuren, J.H.J., Ferreira, J.T. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus*. *J Fish Biol.* 24, 263-272.
- Krysko, D.V., Diez-Fraile, A., Criel, G., Svistunov, A.A., Vandenabeele, P., D'Herde, K., 2008. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 13, 1065–1087.
- Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A., Maise, G., 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev.* 60, 397–404.
- Lacerda, S.M.S.N., Batlouni, S.R., Silva, S.B.G., Homem, C.S.P., França, L.R., 2006. Germ cell transplantation in fish: the Nile tilapia model. *Anim Reprod.* 3, 146–159.
- Lacerda, S.M.S.N., Aponte, P.M., Costa, G.M.J., Campos-Junior, P.H.A., Segatelli, T.M., Silva, M.A., França, L.R., 2012. An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. *Anim Reprod.* 9, 798-808.
- Lahnsteiner, F., 2000. Introduction to the special issue on cryopreservation of gametes in aquatic species. *Aquaculture. Research.* 31, 229.
- Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., França, L.R., Schulz, R.W., 2009. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biol Reprod.* 81, 177-187.
- Lee, C.S., Tamaru, C.S., Banno, J.E. and Kelley, C.D., 1986. Influence of chronic administration of LHRH-analogue and/or 17 α -methyltestosterone on maturation in milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture* 59, 147–159.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research.* 544, 43-64.
- Le Gac, F., Ollitrault, M., Loir, M., Le Bail, P.Y., 1992. Evidence for binding and action of growth hormone in trout testis. *Biol Reprod.* 46, 949–957.

- Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P., Loir, M., Mourot, B., Weil, C., 1993. Growth Hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiol Biochem.* 11, 219–232.
- Leonardo, A.F.G., Romagosa, E., Batlouni S.R., Borella, M.I., 2006. Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 58, 831-840.
- Leonardo, A.F.G., Romagosa, E., Borella, M.I., Batlouni, S.R., 2004. Induced spawning of hatcheryraised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture*, 240: 451-461.
- Lethimonier, C., Madigou, T., Munoz-Cueto, J.-A., Lareyre, J.-J., Kah, O., 2004. Evolutionary aspects of GnRH α , GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 1–16.
- Li, W.S., Chen, D., Wang, A.O., Lin, H.R., 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Gen Comp Endocrinol.* 144, 78–89.
- Lima R.V.A., Bernardino G., Val-Sella M.V., Fava-de-Moraes F., Schemy R.A., Borella M.I., 1991. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos e cativoiro. *Bol. Téc. CEPTA.* 4: 1-46.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J. 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol.* 165, 367-389.
- Luckenbach, J.A., Iliev, D.B., Goetz, F.W., Swanson, P., 2008. Identification of differentially expressed ovarian genes during primary and secondary oocyte growth in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 2–16.
- Luz, R.K., Ferreira, A.A., Reynalte, D.A.T., Zaniboni-Filho, E., 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (pimelodidae). *Bol Inst Pesca.* 27, 39-42.
- Mañanos, E., Carrillo, M., Sorbera, L.S., Mylonas, C.C., Asturiano, J.F., Bayarri, M.J., Zohar, Y., Zanuy, S., 2002. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *J. Fish Biol.* 60, 328–339.
- Mandich, A., Massari, A., Bottero, S., Marino, G., 2002. Histological and histochemical study of female germ cell development in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Eur J Histochem.* 46, 87-100.

- Manolakou, P., Lavranos, G., Angelopoulou, R., 2006. Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 4: 59.
- Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finioia, M.G., Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture* 219, 841–858.
- Martinez-Pastor, F., Cabrita, E., Soares, F., Anel, L., Dinis, M.T. 2008, Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. *Reproduction*. 135: 449-459.
- Matsubara T., Sawano, K., 1995. Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *J Exp Zool*. 272, 34-45.
- Matsuyama, M., Chuda, H., Ikeda, Y., Tanaka, H., Matsuura, S., 1997. Induction of ovarian maturation and ovulation in the cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by different hormonal treatments. *Suisanzoshoku* 45, 67–73.
- Ministério da pesca e Aquicultura, 2010. Boletim estatístico da pesca e aquicultura do Brasil(2008-2009).MPA,Brasília,100p.
- Morehead, D.T., Pankhurst, N.W., Ritar, A.J., 1998. Effect of treatment with LHRH analogue on oocyte maturation, plasma sex steroid levels and egg production in female striped trumpeter *Latris lineata* (Latrididae). *Aquaculture* 169, 315–331.
- Mosconi, G., Carnevali, O., Habibi, H.R., Sanyal, R., Polzonetti-Magni, A.M., 2002. Hormonal mechanisms regulating hepatic vitellogenin synthesis in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Am J Physiol*. 283, C673–C678.
- Mylonas, C.C., Hinshaw, J.M., Sullivan, C.V., 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 106, 379–392.
- Mylonas, C.C., Tabata, Y., Langer, R., Zohar, Y., 1995. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *J. Control. Release* 35, 23–34.
- Mylonas, C.C., Scott, A.P., Vermeirssen, E.L.M., Zohar, Y., 1997a. Changes in plasma gonadotropin II and sex steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release gonadotropin-releasing hormone agonist-delivery systems. *Biol. Reprod*. 57, 669–675.
- Mylonas, C.C., Magnus, Y., Gissis, A., Klebanov, Y., Zohar, Y., 1997b. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. *J. Fish Biol*. 51, 234–250.

- Mylonas, C.C., Woods III, L.C., Thomas, P., Zohar, Y., 1998a. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during post-vitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 276–289.
- Mylonas, C.C., Woods, L.C., III, Thomas, P., Schulz, R.W., Zohar, Y., 1998b. Hormone profiles of captive striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation, and long-term enhancement of milt production. *J. World Aqua. Soc.* 29, 379–392.
- Mylonas, C.C. & Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev Fish Biol Fish.* 10, 463–491.
- Mylonas, C.C., Sigelaki, I., Divanach, P., Mañanós E., Zanuy, S., Afonso-Polyviou, A., 2003. Multiple spawning of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after repeated injections of GnRHa, and evaluation of egg quality. *Aquaculture.* 221, 605-620.
- Mylonas, C.C., Bridges, C.R., Gordin, H., Belmonte Ríos, A., García, A., De la Gándara, F., Fauvel, C., Suquet, M., Medina, A., Papadaki, M., Heinisch, G., De Metrio, G., Corriero, A., Vassallo-Agius, R., Guzmán, J.M., Mañanos, E., Zohar, Y., 2007. Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Rev. Fish. Sci.* 15, 183–210.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte: from Basic Studies to Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 433–470.
- Mylonas, C. C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocr.* 165, 516–534.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop Growth Differ.* 50, S195-S219.
- Negatu, Z., Hsiao, S.M., Wallace, R.A., 1998. Effects of insulin-like growth factor-I on final oocyte maturation and steroid production in *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 13–21.
- Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., França, L.R., 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem.* 35, 197-206.
- Nóbrega, R.H., Greebe, C.D., Van de Kant, H., Bogerd, J., França, L.R., Schulz, R.W., 2010. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS One.* 5, e12808.

- Nynca, J., Kuźmiński, H., Dietrich, G.J., Hliwa, P., Dobosz, S., Liszewska, E., Karol, H., Ciereszko, A., 2012. Changes in sperm parameters of sex-reversed female rainbow trout during spawning season in relation to sperm parameters of normal males. *Theriogenology*. 77, 1381-1389.
- Pankhurst, N.W., Purser, G.J., Van Der Kraak, G., Thomas, P.M., Forteach, G.N.R., 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146, 277–290.
- Parenti, L.R., Grier, H.J., 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr Comp Biol*. 44, 333–348.
- Patiño, R., Sullivan, C.V., 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol Biochem*. 26, 57–70.
- Perez-Cerezales, S., Martinez-Paramo, S., Cabrita, E., Martinez-Pastor, F., De Paz, P., Herraes, M.P., 2009. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology* 71: 605-613
- Peter, R.E., Lin, H.R., Van Der Kraak G., 1988. Induced ovulation and spawnig of culture freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonist. *Aquaculture*, 74: 1-10.
- Peyon, P., Baloche, S., Burzawa-Gerard, E., 1996. Potentiating effect of growth hormone on vitellogenin synthesis induced by 17 beta-estradiol in primary culture of female silver eel (*Anguilla anguilla* L.) hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol*. 102, 263–273.
- Pudney, J., 1993. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: Russell, L.D., Griswold, M.D. (Eds.), *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, pp. 611–657.
- Pudney, J., 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech*.6, 459-497.
- Rohr, D.H., Lokman, P.M., Davie, P.S., Young, G., 2001. 11-Ketotestosterone induces silvering-related changes in immature female short-finned eels, *Anguilla australis*. *Comp. Biochem Phys A* 130, 701–714.
- Romagosa, E., Paiva, P., Godinho, H.M., 1990. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895), induced to spawn. *Aquaculture*. 86, 105-110.
- Romagosa, E., Godinho, H. M, Braga, F. M., 1993. Mudanças morfológicas dos ovários de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. *Bol Inst Pesca*. 20, 67-80.

- Romagosa, E., Narahara, M.Y., 2001, Células germinativas dos testículos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. BIOS. 9, 15-26.
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. 234, 1-28.
- Sahinöz, E., Aral, F., Dogu, Z., 2007. Changes in Mesopotamian spiny eel, *Mastacembelus mastacembelus* (Bank & Solender in Russell, 1794) (Mastacembelidae) milt quality during a spawning period. Theriogenology. 67, 848-854.
- Sampaio, E.V., Sato, Y., 2007. Desova induzida e aspectos reprodutivos de *Curimatella lepidura* (Eig. & Eig., 1889) (Osteichthyes, Characiformes), espécie endêmica da bacia do rio São Francisco. Revista Brasileira de Zootecias, 9 (2): 135- 142.
- Santos, E.M., Rand-Weaver, M., Tyler, C.R., 2001. Follicle-stimulating hormone and its a and b subunits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): purification, characterization, development of specific radioimmunoassay, and their seasonal plasma and pituitary concentrations in females. Biol Reprod. 65, 288–294.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Verani, J.R., Vieira, L.J.S., Godinho, H.P., 2000. Induced reproductive responses of the neotropical anostomid fish *Leporinus elongatus* Val. under captive breeding. Aquaculture Research, 31, 189-193.
- Schreck, C. B., 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. Gen Comp Endocr. 165, 549–556.
- Schulz, R.W., Miura, T., 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiol Biochem. 26, 43-56.
- Schulz, R.W., Menting, S., Bogerd, J., Franca, L.R., Vilela, D.A.R., Godinho, H.P., 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis: evidence from two fish species belonging to different orders. Biol Reprod. 73, 891–898.
- Schulz, R. W., França L. R., Lareyre, J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., Miura T., 2010. Spermatogenesis in fish. Gen Comp Endocr. 165, 390–411.
- Sciara, A.A., Robiolo, J.A., Somoza, G.M., Arranz, S.E., 2006. Molecular cloning expression and immunological characterization of pejjerey *Odontesthes bonariensis* growth hormone. Comp Biochem Physiol. 142, 284–292.
- Selman, S.,Wallace, R.A., Sarka, A., Qi, X., 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. J Morphol. 218, 203–224.

- Sherwood, N.M., Crim, L.W., Carolsfeld, J. and Walters, S.M., 1988. Sustained hormone release. I. Characteristics of in vitro release of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) from pellets. *Aquaculture* 74, 75–86.
- Silva-Filho, J.A., 1981. Contribuição ao estudo da reprodução induzida da piapara *Leporinus obtusidens*, em cativeiro com uso da hipófise fresca da piava catingada, *Schizodon fasciatus*, e Pregnyl. In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca. Recife Anais, 2, 179-185.
- Singh, H., Thomas, P., 1993. Mechanism of stimulatory action of growth hormone on ovarian steroidogenesis in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. *Gen Comp Endocr.* 89, 341–353.
- Sire, M.F., Babin, P.J., Vernier, J.-M., 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. *J Exp Zool.* 269, 69–83.
- Slater, C., Schreck, C.B., Swanson, P., 1994. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 167–175.
- Swanson, E.W., Bearden, H.J., 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J Anim Sci.* 10, 981-987.
- Swanson, P., Dickey, J.T., Campbell, B., 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 53–59.
- Trudeau, V.L., 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod.* 2, 55–68.
- Trudeau, V.L., 2010. Comparative neuroendocrinology: Integration of hormonal and environmental signals in vertebrates and invertebrates, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Volume 144, Issue 3, July 2006, Pages 243-246
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev Fish Biol Fisher.* 6, 287-318.
- Urbinati, E.C., Gonçalves, F.D. & Takahashi, L.S. 2010. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*, edn. UFSM, Santa Maria, Brasil. pp. 205-244.
- Von Ihering R, Azevedo P. 1936. A desova e a hipofisação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. *Archivos do Instituto de Biologia.* 7, 107-118.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am Zool.* 21, 325–343.

- Wang, Z., Crim, L.W., 1997, Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus*. *Fish Physiol Biochem.* 16, 77-83.
- Watanabe, W.O., Smith, T.I.J., Berlinsky, D.L., Woolridge, C.A., Stuart, K.R., Copeland, K.A., Denson, M.R., 2003. Volitional spawning of black sea bass *Centropristis striata* induced with pelleted luteinizing hormone releasing hormone-analogue. *J. World Aquat. Soc.* 34, 319–331.
- Weber, G.M., Borski, R.J., Powell, J.F.F., Sherwood, N.M., Grau, E.G., 1995. In vivo and in vitro effects of gonadotropin-releasing hormone on prolactin in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Am. Zool. (Abstr.)* 34, 121A.
- Weil, C., Crim, L.W., 1983. Administration of LHRH analogues in various ways: effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 35, 103–115.
- Wong, A.O., Zhou, H., Jiang, Y., Ko, W.K. 2006. Feedback regulation of growth hormone synthesis and secretion in fish and the emerging concept of intrapituitary feedback loop. *Comp Biochem Physiol.* 144A, 284–305.
- Zaniboni-Filho, E., Barbosa, N.D.C., 1996. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia*, 56, 655-659.
- Zaniboni – Filho, E., Weingart, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev Bras Reprod Anim.* 31, 367-373.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.
- Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocr.* 165, 438–455.