

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

**Biologia reprodutiva e qualidade do sêmen de reprodutores  
de curimatá, *Prochilodus lineatus*, em condições distintas de  
manejo.**

**Thiago Gonçalves de Souza**  
**Zootecnista**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Biologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2011

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

**Biologia reprodutiva e qualidade do sêmen de reprodutores  
de curimatá, *Prochilodus lineatus*, em condições distintas de  
manejo.**

**Mestrando: Thiago Gonçalves de Souza**

**Orientador: Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Biologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2011

S729b Souza, Thiago Gonçalves de  
Biologia reprodutiva e qualidade do sêmen de reprodutores de curimatã, *Prochilodus lineatus*, em condições distintas de manejo / Thiago Gonçalves de Souza. -- Jaboticabal, 2011  
xi, 70 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, 2011

Orientador: Sergio Ricardo Batlouni

Banca examinadora: Maria Inês Borella, Carlos Alberto Vicentini

Bibliografia

1. Ciclo reprodutivo. 2. Reprodutores. 3. Características seminais.  
4. *Prochilodus lineatus* I. Título. II. Jaboticabal- Centro de Aquicultura da UNESP.

CDU 639.3.03

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** Biologia reprodutiva e qualidade do sêmen de reprodutores de curimatã, *Prochilodus lineatus*, em condições distintas de manejo

**AUTOR:** THIAGO GONÇALVES DE SOUZA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI

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



Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI  
Laboratório de Reprodução de Peixes / CAUNESP, Jaboticabal



Prof. Dra. MARIA INÉS BORELLA  
Departamento de Histologia e Embriologia / Universidade de São Paulo



Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VICENTINI  
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru

Data da realização: 30 de agosto de 2011.

*Dedico esse trabalho:*

*Aos meus pais, Norlei e Inês.*

*Aos meus irmãos, Artur e Mateus.*

*A minha namorada, Juliana.*

*A minha família.*

*A meus amigos.*

## *Agradecimento especial*

### A Deus

Agradeço a Deus por me conceder saúde e uma família maravilhosa.

### A minha família

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

### Ao Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni

Agradeço imensamente a orientação e amizade do Prof. Sergio que possibilitou a realização desse trabalho e tornou o caminho traçado pelos seus orientados mais simples. Com ele aprendi o significado da palavra “Orientação”.

### Aos amigos do Laboratório

Agradeço a todos do Laboratório de Reprodução de Peixes Nativos em especial a Patrick, Mario, Rafael, Marianne, Thiago, Eduardo, Guilherme e Daniel, pela ajuda, amizade, companheirismo e dedicação nos momentos mais difíceis.

*Muito Obrigado!!*

## *Agradecimentos*

*À Profa. Elizabeth Criscuolo Urbinati, Maria Inês Borella e ao Prof. Carlos Alberto Vicentini pelo auxílio, sugestões e por compartilhar o grande conhecimento.*

*À Profa. Renata Guimarães Moreira e equipe pela ajuda nas coletas e por conceder o acesso ao laboratório no Departamento de Fisiologia Geral da USP.*

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

*Aos Professores e Colegas do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal em especial à Profa. Laura Satiko Okada Nagashi, Nivaldo e Fernanda pela ajuda, companheirismo e empréstimo de material.*

*Aos Professores e Colegas do Setor de Ranicultura em especial à Thalita e Regiane pela grande ajuda nos experimentos.*

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

*Aos Professores e Colegas do Setor de Nutrição de Organismos Aquáticos e Larvicultura pelo empréstimo de materiais e acesso ao laboratório.*

*Aos Professores e Colegas do Setor de Tilapicultura em especial à Profa. Teresa Cristina e Munir pelo empréstimo de materiais.*

*Aos Funcionários Mauro, Valdecir e Marcio pela grande ajuda concedida em dias ensolarados, chuvosos ou frios. À Técnica de laboratório do Centro de Aquicultura, Silvinha, pela ajuda e empréstimo de materiais.*

*Ao Histotécnico Orandir Mateus pela grande ajuda concedida na preparação de lâminas e cortes histológicos, conversas e empréstimo de material.*

*Agradeço ao pessoal dos setores não citados, em especial a Camila, Thais e Cintia pela ajuda e companheirismo.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Protocolo: 002307-09, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.*

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

## Sumário

### CAPÍTULO I

<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>2</b>
1.1	<i>Indução hormonal .....</i>	4
1.2	<i>Controle endócrino .....</i>	5
1.3	<i>Condições de cultivo inadequado.....</i>	7
1.4	<i>Caracterização testicular .....</i>	8
1.5	<i>Espermatogênese.....</i>	10
1.6	<i>Danos oxidativos em espermatozoides.....</i>	12
1.7	<i>Ensaio cometa .....</i>	13
<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>15</b>

### CAPÍTULO II

	<b>RESUMO .....</b>	<b>27</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>28</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
2.1	<i>Animais.....</i>	31
2.2	<i>Condições de cultivo .....</i>	32
2.3	<i>Biometrias .....</i>	32
2.4	<i>Parâmetros físicos e químicos da água.....</i>	33
2.5	<i>Determinação do fator de condição.....</i>	33
2.6	<i>Determinação do valor de IGS.....</i>	34

2.7	<i>Avaliação histológica dos testículos</i> .....	34
2.8	<i>Análise de esteroides</i> .....	35
2.9	<i>Análise de sêmen</i> .....	36
2.10	<i>Ensaio cometa</i> .....	37
2.11	<i>Reprodução induzida e desenvolvimento embrionário</i> .....	39
2.12	<i>Análise estatística</i> .....	40
<b>3</b>	<b><i>RESULTADOS</i></b> .....	<b>40</b>
3.1	Parâmetros físicos e químicos da água .....	40
3.2	Características gerais dos reprodutores .....	41
3.3	Estrutura testicular .....	42
3.4	Desenvolvimento testicular: valores de IGS .....	43
3.5	Histomorfometria dos testículos .....	44
3.6	Esteroides gonadais .....	51
3.7	Características seminais .....	52
3.8	Ensaio cometa .....	52
3.9	Desempenho reprodutivo .....	54
<b>4</b>	<b><i>DISCUSSÃO</i></b> .....	<b>54</b>
4.1	Estrutura testicular .....	54
4.2	Características gerais .....	55
4.3	Sistemas de produção .....	56
4.4	Histomorfometria dos testículos .....	58
4.5	Espermatogênese .....	59
4.6	Esteroides gonadais .....	61
4.7	Parâmetros espermáticos .....	63
<b>5</b>	<b><i>CONCLUSÃO</i></b> .....	<b>64</b>
<b>6</b>	<b><i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i></b> .....	<b>64</b>

## Índice de figuras

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** (a-f) Valores médios mensais com os respectivos erros padrão (mínimo e máximo) das características da água nos viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR), correspondentes ao período de manutenção dos animais representados por: (a) oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), (b) condutividade ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ), (c) pH, (d) amônia ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), (e) transparência (cm) e (f) temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )..... 41
- Figura 2.** (a-b) Valores médios de: (a) peso (g) e (b) fator de condição (%), de *P. lineatus*, ao longo do ano, em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR). Letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ ), enquanto as minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os bimestres ( $p < 0,05$ ). ..... 42
- Figura 3.** Vista da disposição dos testículos de machos de curimatã (*P. lineatus*). Assinalados: mesórquio (seta); tecido adiposo de sustentação (ponta de seta); testículo direito (Td); testículo esquerdo (Te); Bexiga natatória (Bn)..... 43
- Figura 4.** Índice gonadossomático dos animais mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR) ao longo do ano. Letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ ), enquanto as minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os bimestres ( $p < 0,05$ ). ..... 44
- Figura 5.** (a-f) Frequência dos distintos tipos de túbulos seminíferos, baseado na presença dos diferentes tipos celulares germinativos, nos testículos de machos mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR). (a) Apenas espermatogônias; (b) cisto de espermatogônias; (c) cisto de espermátocitos primários ou secundários; (d) cisto de espermátides; (e) espermatozoides no lúmen; e (f) frequência de túbulos com epitélio germinativo descontínuo. Asteriscos indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ )..... 45

- Figura 6.** (a-l) Fotomicrografia da característica histológica dos túbulos seminíferos de *P. lineatus*, por meio de cortes transversais de testículos (5 $\mu$ m), em animais mantidos em viveiros escavados (a; c; e; g; i; k) e tanques-rede (b; d; f; h; j; l), ao longo do ano (Barra = 50  $\mu$ m). Hematoxilina-eosina..... 48
- Figura 7.** Diâmetro de túbulos seminíferos de testículo de curimatá (*P. lineatus*) mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR) ao longo do ano. Letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ ), enquanto as minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os bimestres ( $p < 0,05$ ). ..... 49
- Figura 8.** (a-b) Níveis plasmáticos de (a) Testosterona (ng/mL) e (b) 11-Cetotestosterona (ng/mL), em *P. lineatus*, mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR). Letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ ), enquanto as minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os bimestres ( $p < 0,05$ )..... 52
- Figura 9.** (a-b) Análise de danos de DNA do sêmen de reprodutores de *P. lineatus* mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR). (a) Frequência por classe de danos (%) e (b) Índice de danos (%). Asteriscos indicam as diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ )..... 53
- Figura 10.** Classes de danos (0-4) de DNA de acordo com a intensidade de fragmentação na cauda do cometa..... 53

## Índice de tabelas

### CAPÍTULO II

<i>Tabela 1.</i> Análise de sêmen de curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> , mantidos em viveiros escavados e tanques-rede.....	52
<i>Tabela 2.</i> Média e erro padrão das taxas de fertilidade de ovos e eclosão de larvas de curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> , comparada em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR). .....	54

# **CAPÍTULO I**

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Brasil tem sua piscicultura constituída principalmente pelo cultivo de espécies exóticas introduzidas, tais como a carpa comum (*Ciprinus carpio*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*). Isso se deve as grandes vantagens competitivas em relação às espécies nativas, não só pela rusticidade que caracteriza tais espécies, como também pelo fato de existir informações detalhadas sobre suas principais características biológicas e zootécnicas, que podem assim ser aproveitadas em condições de cultivo (Boscardin, 2008). Há, no Brasil, um imenso potencial natural para o uso de espécies nativas na aquicultura, que poderão atender os mais variados nichos de mercado. Entretanto, o uso de um maior número de espécies em empreendimentos aquícolas implica também na necessidade de maiores investimentos em pesquisas para o desenvolvimento de “pacotes tecnológicos”. Surpreendentemente, dentre as espécies de peixes dulciaquícolas, muitas vezes, os peixes migradores nativos são os que apresentam maior preço de mercado (Ceccarelli *et al.*, 2000; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). As espécies migradoras ou reofílicas são aquelas que durante um determinado período realizam migrações ao longo dos rios para reproduzir (Resende *et al.*, 1995; Alvarenga *et al.*, 2006; Capeleti *et al.*, 2006; Godinho *et al.*, 2007; Honji 2007; e muitos outros).

Dentre as espécies reofílicas nativas, o curimatá, *Prochilodus lineatus*, se destaca por ser uma das mais bem estudadas com relação à sua reprodução (Fenerich-Verani *et al.*, 1984; Godinho *et al.*, 1984; Godinho e Ribeiro, 1985), e larvicultura (Cestarolli e Portella, 1994; Portella *et al.*, 2000 a, b e c; Zaniboni-Filho *et al.*, 2009). Esta espécie apresenta-se como um bom modelo de estudo por apresentar: relativa rusticidade; maturidade sexual aos dois anos, nas fêmeas, e um ano, nos machos (em

cativeiro) (Godinho e Ribeiro, 1985); além disso, apresenta bons resultados quando tem sua reprodução induzida por hormônios (Fenerich-Verani *et al.*, 1984, Godinho *et al.*, 1984).

O curimatá é um peixe de ocorrência na bacia dos rios Paraná Grande, Pardo e Mogi-guaçu. Esta espécie caracteriza-se pela boca protáctil que permite a exploração de substratos diferenciados no sedimento (Furuya, 2001). Quanto ao hábito alimentar esses peixes são iliófagos ou detritívoros, ou seja, alimenta-se de organismos bentônicos (larvas de insetos; larvas e ovos de moluscos, crustáceos, entre outros organismos) e detritos orgânicos comumente encontrados na água (resíduos planctônicos, fezes de outros peixes, entre outros) (Castagnolli, 1992; Proença e Bittencourt, 1994). O gênero *Prochilodus* destaca-se por sua ampla distribuição na região Neotropical, e possui 13 espécies descritas até o momento (Reis *et al.*, 2003 e Castro e Vari, 2004).

A espécie curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), apresenta a seguinte posição sistemática:

Reino: Animalia

Filo: Chordata / Subfilo: Vertebrata

Superclasse: Gnathostomata / Classe: Actinopterygii / Subclasse: Neopterygii /

Infraclasse: Teleostei

Superordem: Ostariophysi / Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836).

Nome popular: curimatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e corimatá.

O curimatá é cultivado apenas na América do Sul, sendo o Brasil o líder absoluto, com 98% da produção em 2004 (IBAMA, 2006). Essa espécie proporciona elevada taxa de crescimento, carne com excelente palatabilidade e o hábito alimentar detritívoro permite o cultivo desses peixes como espécie secundária, se alimentando de resíduos da alimentação dos peixes criados como espécie principal (Proença e Bittencourt, 1994). O cultivo do curimatá mostra-se viável quando realizado em viveiro ou tanques escavados, uma vez que a matéria orgânica que está no fundo, que lhe serve como alimento, está disponível e facilmente acessível (Borghetti, 2008).

Em sistemas de produção de peixes, manipulações hormonais podem ser utilizadas como ferramentas para aumentar a eficiência da produção de ovos e espermiacão (revisão em Mylonas *et al.*, 2010). No entanto, um profundo conhecimento do controle endócrino da espermiogênese, maturação e espermiacão são essenciais para a administração adequada da espécie a fim de desenvolver protocolos de procedimentos para aquisição de gametas viáveis.

### ***1.1 Indução hormonal***

A reprodução de peixes reofílicos em cativeiro só é alcançada mediante indução por hormônios (revisão em Mylonas *et al.*, 2010). Os primeiros trabalhos de indução à desova de peixes reofílicos, conduzidos na Argentina e no Brasil (Houssay, 1930; Ihering, 1935), conhecida como “hipofiseação”, resultou em maturação final e desova de peixes migradores a partir da aplicação de hormônios naturais presentes na hipófise de peixes maduros (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

Em geral, os machos apresentam um longo período de espermiacão, que abrange a época de desova das fêmeas por alguns meses, e podem fertilizar ovos de várias fêmeas na natureza (revisão em Mylonas *et al.*, 2010). A reprodução induzida vem sendo muito estudada e existem vários relatos de diferentes indutores hormonais. Como

exemplo, Streit Jr. *et al.* (2004) testaram a qualidade seminal em *P. lineatus* por meio da indução com extratos hipofisários de carpa, frango e coelho. Os autores demonstraram que o extrato hipofisário de frango apresentou eficiência semelhante ao tradicional extrato hipofisário de carpa.

Devido a evidências de pouca liberação de hormônio luteinizante (LH) pela hipófise há registros de diversas falhas na indução à espermiacção completa. As disfunções mais comuns incluem a produção de menor quantidade de sêmen e volume seminal. Com isso, a manipulação da reprodução tem-se focado na preparação de LH exógenos, que agem diretamente nas gônadas, e mais recentemente na utilização de GnRH, que libera das reservas da hipófise o LH endógeno (revisto em Mylonas *et al.*, 2010).

As preparações do hormônio luteinizante para uso na hipofisação basicamente incluem: (a) extratos homogeneizados e purificados de hipófise de peixes maduros, durante a época reprodutiva, que contém altos níveis de LH (comumente Carpa e alguns Salmonídeos); e (b) purificação da gonadotropina coriônica humana que tem uma atividade de LH muito forte (revisto em Mylonas *et al.*, 2010).

## **1.2 Controle endócrino**

A reprodução de peixes teleósteos é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Fatores ambientais, como fotoperíodo, temperatura e chuvas, são detectados por receptores específicos, como a glândula pineal e receptores cutâneos; e transmitidos via neurônios sensoriais para o hipotálamo. Esses fatores estimulam o hipotálamo a sintetizar e liberar o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e dopamina. O GnRH estimula a secreção dos hormônios gonadotrópicos: hormônio folículo estimulante (FSH) e LH, pelas células gonadotrópicas da hipófise (Redding e Patiño,

1993; Nagahama, 1994; Vazzoler, 1996; Peter e Yu, 1997; Blázquez *et al.*, 1998; Baldisserotto, 2002; Weltzien *et al.*, 2004).

As gonadotropinas, FSH e LH (anteriormente conhecido como GtH I e II, respectivamente), são os hormônios mais importantes da hipófise que regulam a fisiologia testicular. A dopamina inibe a liberação dessas gonadotropinas, de modo direto ou indireto (inibindo o efeito estimulador do GnRH). O FSH desempenha um papel importante regulando estágios iniciais da espermatogênese, enquanto o LH é o principal envolvido na fase final de maturação. No início da proliferação espermatogonial, o FSH tem a função de estimular a produção de esteroides induzindo a espermatogênese, como a 11-cetotestosterona (11-KT), ou seja, o FSH pode induzir a produção de 11-cetotestosterona (Miura *et al.*, 1991; Kamei *et al.*, 2005; Ohta *et al.*, 2007). Por sua vez, o LH induz a síntese de testosterona pelas células de Leydig, o qual influencia negativamente (feedback negativo) na liberação de hormônio no hipotálamo e na hipófise.

Durante a época de reprodução de peixes teleósteos, os níveis hormonais plasmáticos, em machos, mudam notavelmente começando pelo aumento na secreção de LH. Esta mudança induz um aumento na produção dos esteroides testiculares, tais como 11-KT. O LH e este esteroide estão envolvidos na regulação da espermição em peixes (revisão em Schulz *et al.*, 2010).

A 11-KT foi identificado pela primeira vez em machos de salmão-vermelho (*Oncorhynchus nerka*) por Idler *et al.* (1961) como um importante esteroide androgênico. A função deste hormônio para espermatogênese ficou claro pela primeira vez em enguia japonesa (*Anguilla japonica*), por meio de um sistema de cultura *in vitro* de células do testículo (Miura *et al.*, 1991). Quando 11-KT foi adicionado à cultura, a espermatogênese foi induzida a partir da proliferação das espermatogônias a

espermiogênese. Essa ação de 11-KT não se limita à enguia japonesa, pois foi reconhecido também em goldfish e Huchen japonês (Kobayashi *et al.*, 1991; Amer *et al.*, 2001). Esses achados indicam que 11-KT é um dos envolvidos na iniciação da proliferação das espermatogônias em direção a meiose.

### ***1.3 Condições de cultivo inadequado***

A densidade de estocagem e, portanto, o volume de água por peixe é um fator significativo na determinação de produção de peixes. O aumento da densidade de estocagem resulta em estresse (Leatherland e Cho, 1985) que tem como consequência redução do crescimento e menor aproveitamento dos alimentos, por demandar maior energia. A densidade de estocagem ideal para uma espécie pode ser um fator crítico no sistema de cultivo (Hengsawat, 1997). É bem aceito na literatura que a nutrição dos reprodutores pode impactar significativamente no desempenho reprodutivo. As exigências nutricionais dos reprodutores devem ser cumpridas a fim de amparar o desempenho reprodutivo (revisão em Bobe e Labbé, 2010), evitando depreciação não apenas na fecundidade e na gametogênese, mas também na qualidade dos gâmetas e na sobrevivência de embriões e larvas (Kjörsvik *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 1997; Asturiano *et al.*, 2001; Izquierdo *et al.*, 2001). Estudos demonstram que a composição lipídica da dieta afeta a composição lipídica do esperma, mesmo quando as exigências nutricionais essenciais estão satisfeitas (Labbe *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1996; Pustowka *et al.*, 2000; Asturiano *et al.*, 2001), resultando em baixa eficiência na motilidade dos espermatozoides (revisão em Bobe e Labbe, 2010). Neste contexto, o sistema de produção em tanques-rede é recomendado apenas para as fases de engorda, não sendo apropriadas para reprodutores devido às elevadas densidades de estocagem utilizadas para o alto rendimento do sistema (Ceccarelli *et al.*, 2000).

Segundo Mallasen (2008) a criação de peixes em tanques-rede é uma modalidade de criação intensiva que utiliza elevada densidade de estocagem e exige constante renovação de água. Os resíduos gerados, constituídos por alimentos não ingeridos e produtos do metabolismo dos peixes, são liberados diretamente no ambiente, aumentando principalmente a concentração de nitrogênio e de fósforo na água, que favorecem a proliferação de organismos vegetais como as algas e plantas aquáticas. Este processo é chamado de eutrofização artificial. De acordo com o mesmo autor, o aporte de matéria orgânica proveniente de restos de ração e excretas dos peixes, exige um consumo do oxigênio dissolvido para degradação desta matéria orgânica na água e, em consequência desse processo, há liberação de produtos que favorecem o processo de eutrofização.

#### ***1.4 Caracterização testicular***

Na maioria dos teleósteos os testículos são órgãos pares, alongados, fixados à parede dorsal do corpo por meio do mesórquio. Ambos os testículos estão aderidos caudalmente, convergindo em um sistema de dutos eferentes central que é aberto ao exterior através do poro urogenital (Grier e Uribe-Aranzábal, 2009). Os testículos mudam morfológicamente durante o ciclo reprodutivo anual, no entanto, suas funções básicas de produzir e estocar espermatozoides são mantidas (Grier, 2002; Grier e Uribe-Aranzábal, 2009).

De acordo com Grier e Uribe-Aranzábal (2009), os testículos dos teleósteos podem ser classificados em três tipos, dependendo da organização do compartimento germinativo, sendo eles, lobular espermatogonial restrito, lobular espermatogonial irrestrito e tubular anastomosado. Desta forma são classificados como (1) “lobular espermatogonial restrito”, quando o compartimento germinativo termina em fundo cego na periferia testicular, porém as espermatogônias não são distribuídas ao longo das

paredes lobulares e sim, restritas à extremidade dos lóbulos. Durante a espermatogênese, os cistos de células germinativas em diferenciação são deslocados ao longo dos lóbulos e, ao final da espermiogênese, se abrem e liberam espermatozoides nos ductos eferentes. Este tipo ocorre em espécies de poecilídeos; (2) “lobular espermatogonial irrestrito” quando o compartimento germinativo, de formato digitiforme, se estende até a periferia do testículo terminando em fundo cego, formando um lóbulo. Caracteriza-se pela distribuição das espermatogônias ao longo dos lóbulos. Durante a espermição, os espermatozoides são liberados dentro do lúmen lobular. Este tipo ocorre nos neoteleósteos, exceto em Atherinomorpha; e (3) “tubular anastomosado” quando o compartimento germinativo é formado por uma rede intercomunicada por toda a extensão do testículo e apresenta um sistema de túbulos ramificados desde a periferia até o ducto testicular principal (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004). Neste, as espermatogônias encontram-se distribuídas ao longo dos túbulos seminíferos, tendo um padrão espermatogonial irrestrito. Este tipo é característico dos teleósteos mais “basais” na escala evolutiva (Grier, 1993; Pudney, 1995), no qual se inclui o *P. lineatus*.

No interior dos testículos de peixes, assim como em todos os outros vertebrados, podem ser encontrados dois tipos de compartimentos; compartimento germinativo e compartimento intersticial, sendo ambos separados por uma membrana basal, constituída por lâmina basal e fibras reticulares. O epitélio germinativo do testículo é composto por dois tipos celulares: células germinativas e somáticas (Grier, 1993 e 2002). As células somáticas são as células de Sertoli, que tem a função de nutrição, suporte e fagocitose; e as células germinativas são as que darão origem aos espermatozoides.

Já o tecido intersticial testicular (intertubular) é constituído por fibroblastos, fibras colágenas, células mioides, células de Leydig e células sanguíneas (Grier *et al.*,

1989; Reinboth e Bruslé-Sicard, 1997; Cinquetti e Dramis, 2003). As células intersticiais de Leydig, no testículo de muitas espécies de peixes, são as principais fontes de esteroides gonadais (Hoar e Nagahama, 1978; Loir, 1990a,b; Cinquetti, 1994).

Segundo Weltzien *et al.* (2004), os testículos tem a função de produzir esteroides sexuais (esteroidogênese) e fatores de crescimento, que são importantes para a regulação da reprodução, além de produzir células germinativas em um processo chamado espermatogênese.

### ***1.5 Espermatogênese***

Espermatogênese é um processo altamente organizado e coordenado, no qual espermatogônias diploides proliferam e se diferenciam para formar os espermatozoides maduros. A duração deste processo é geralmente mais curta em peixes do que em mamíferos e também é influenciada pela temperatura da água (Nóbrega *et al.*, 2009; Shulz *et al.*, 2010).

Um importante aspecto a ser considerado é como o processo de produção de espermatozoides ocorre nos testículos. Nos testículos, os espermatozoides são formados dentro de estruturas conhecidas como túbulos seminíferos. Nestes túbulos os espermatozoides são formados em unidades conhecidas como espermatocistos, que se desenvolvem quando uma espermatogônia (célula germinativa indiferenciada) é envolvida por prolongamentos de células de Sertoli (células somáticas do testículo). A transformação celular, que produz células germinativas haploides masculinas (espermatozoides), apresentam três etapas: 1) fase proliferativa ou espermatogonial, quando as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões celulares; 2) meiótica ou espermatocitária, quando o material genético é duplicado, recombinado, e segregado; e 3) a diferenciação ou espermiogênese, quando as espermátides passam por drásticas mudanças morfológicas e funcionais, tais como a condensação nuclear e o

desenvolvimento do flagelo, dando origem ao espermatozoide o qual é estruturalmente equipado para alcançar e fertilizar os ovócitos (revisão em Grier, 1993; Nóbrega *et al.*, 2009). De acordo com as informações mais recentes (revisão em Schulz *et al.*, 2010), os hormônios desempenham um papel crítico de regulação até a fase meiótica da espermatogênese.

Os espermatozoides são lançados nos dutos espermáticos durante a espermiacção. O fluido no qual os espermatozoides são suspensos no lúmen tubular, após espermiacção, é produzido pelas células de Sertoli (revisão em Schulz *et al.*, 2010). O esperma é ejaculado espontaneamente pelos peixes e, com exceção de alguns bagres (Viveiros *et al.*, 2002; Mansour *et al.*, 2004), ele também pode ser expelido facilmente dos testículos após uma suave pressão abdominal. Espermiacção e ejaculação podem ser sincronizadas com a reprodução das fêmeas por meio da comunicação através de feromônios (Stacey, 2003). A obtenção de uma elevada taxa de fecundação é limitada por dois fatores primordiais, sendo eles a duração da motilidade espermática e o tempo de abertura da micrópila (Rurangwa *et al.*, 1998).

A maioria dos espermatozoides de peixes teleósteos com fecundação externa não apresenta acrossoma, e a ausência desta estrutura é compensada pela presença de uma micrópila no ovócito (Cosson *et al.*, 1999), uma pequena abertura localizada no polo animal da célula (Laale, 1980) por meio do qual o espermatozoide penetra (Riehl, 1993). A forma afunilada da micrópila revela que a abertura interna do canal permite a entrada de um único espermatozoide, de acordo com estudos realizados por Kobayashi e Yamamoto (1981); Hart e Donovan (1983); Rizzo e Bazzoli (1993). Neste contexto, alguns estudos foram direcionados para obter volumes adequados de solução que ativam os espermatozoides para a fecundação. Volumes elevados de solução ativadora podem impedir o encontro do espermatozoide com a micrópila, devido à diluição excessiva do

meio (Chereguini *et al.*, 1999; Bombardelli *et al.*, 2006). Em contrapartida, a adição insuficiente de solução ativadora reduz o sucesso na fertilização artificial, pois pode causar a obstrução da micrópila pelo muco ovariano ou até mesmo pelo contato entre ovócitos, além de prejudicar a ativação dos espermatozoides (Woynarovich e Horváth, 1983; Ninhaus-Silveira *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2007; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

### **1.6 Danos oxidativos em espermatozoides**

A qualidade do sêmen produzido por reprodutores de peixes é altamente variável e depende de inúmeros fatores intrínsecos (espécie, idade e carga genética) (Bromage, 1995) e extrínsecos (qualidade do alimento, variações ambientais, higidez e período reprodutivo). Para haver sucesso na fertilização é imprescindível que os espermatozoides, “in natura” ou criopreservados, apresentem boa qualidade (Billard *et al.*, 1995; Johnson, 2000; Rurangwa *et al.*, 2004).

Desde o início de 1990, estudos substanciais têm sido conduzidos para analisar a integridade do DNA, no esperma humano, e para produzirem informações importantes sobre a possível relação do dano oxidativo do DNA de espermatozoides, com defeitos na função espermática e infertilidade masculina. O dano oxidativo ao DNA se refere às alterações funcionais ou estruturais do DNA resultante das injúrias de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são produtos do metabolismo celular normal, visto que de 1 a 2% do oxigênio utilizado para a respiração mitocondrial são convertidos em EROs (Kowaltowski *et al.*, 2009). Modificação de base do DNA e das rupturas dos filamentos de DNA são duas das principais formas de dano oxidativo ao DNA causados por EROs (Shen, 2000).

Em geral, as EROs podem atacar uma variedade de macromoléculas biológicas como o DNA, proteínas e lipídios, causando danos oxidativos. Exemplos de lesões de

DNA produzidos por agentes químicos e físicos incluem rupturas dos filamentos, modificações de bases, ligações cruzadas DNA-DNA e ligações cruzadas DNA-proteína (Kelly *et al.*, 1998).

Uma série de produtos químicos, associado com danos no DNA, tem sido testada em animais aquáticos vivos, tecidos isolados ou diferentes tipos de células. Estes produtos químicos podem ser agrupados em quatro classes: (1) produtos químicos que agem diretamente no DNA; (2) produtos químicos cujos metabólitos causam danos ao DNA; (3) substâncias químicas que causam a produção de EROs que podem danificar o DNA; e (4) produtos químicos que inibem a síntese de DNA e reparo. Além disso, muitos contaminantes químicos danificam o DNA por múltiplos mecanismos (revisão em Lee e Steinert, 2003).

Em animais aquáticos, danos ao DNA têm sido associados com diminuição do crescimento, desenvolvimento anormal e sobrevivência reduzida de embriões, larvas e adultos (revisão em Lee e 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 monitoramento da qualidade do esperma é um passo importante na seleção de reprodutores masculino e pode fornecer algumas pistas para problemas nos espermatozoides. Qualquer parâmetro quantificável que diretamente se correlaciona com a capacidade de fecundação dos espermatozoides pode potencialmente ser usados como uma medida de qualidade espermática (Beirão *et al.*, 2009).

### **1.7 Ensaio cometa**

Uma variedade de métodos foi desenvolvida para a detecção de danos em fita de DNA, como os micronúcleos e ensaios de troca de cromátides-irmã. Um método mais

recente, chamado de eletroforese em gel de célula única ou teste do cometa, detecta quebras de filamentos de DNA e sítios álcali-lábeis através da mensuração da migração do DNA a partir do DNA nuclear imobilizado (revisão em Lee e Steinert, 2003).

As vantagens do ensaio cometa para avaliar danos no DNA dos animais aquáticos incluem: (1) mensuração de danos ao DNA em células individuais; (2) apenas um número pequeno de células é necessário para a realização do ensaio (<10.000); (3) o ensaio pode ser executado em praticamente qualquer tipo de célula eucariótica; e (4) é um método muito sensível para a detecção de danos no DNA (revisão em Lee e Steinert, 2003).

Resumidamente, o ensaio cometa consiste na aplicação de células espalhadas sobre uma superfície coberta com um gel de agarose, e estas são tratadas com uma solução que lisa os componentes celulares deixando o DNA imobilizado na agarose. Em seguida, são submetidos a um processo de desnaturação do DNA seguido de eletroforese, induzindo a migração dos fragmentos de DNA nuclear. Após a coloração específica do DNA, por fluorescência, as rupturas dos filamentos de DNA são apresentadas em uma forma que lembra um cometa, com o DNA fragmentado dispersos na cauda deste cometa. Análises de imagem fornecem informações sobre a extensão de rupturas dos filamentos da molécula de DNA (Perez-Cerezales *et al.*, 2009).

Neste contexto, o sistema de manejo aplicado aos reprodutores merece atenção especial, já que feito de forma inadequada pode refletir na qualidade do sêmen, reduzindo a taxa de fertilização de ovos, podendo ocasionar a indisponibilidade e inconstância na produção de larvas. Desta maneira, é possível alavancar informações básicas e essenciais para ajudar a consolidar a reprodução bem sucedida de reprodutores de espécies migradoras nativas, já que a reprodução em cativeiro é o alicerce do cultivo

de qualquer espécie, especialmente no caso das espécies de peixes nativas, que precisam invariavelmente ser induzidas hormonalmente.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, E.R.; BAZZOLI, N.; SANTOS, G.B.; RIZZO, E. (2006). Reproductive biology and feeding of *Curimatella lepidura* (Eigenmann & Eigenmann) (Pisces, Curimatidae) in Juramento reservoir. *Revista Brasileira de Zoologia*. Minas Gerais, Brazil, 23 (2): 314-322.
- AMER, M.A.; MIURA, T.; MIURA, C.; YAMAUCHI, K. (2001). Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biology of Reproduction*. 65: 1057-1066.
- ASTURIANO, J.F.; SORBERA, L.A.; CARILLO, M.; ZANUY, S.; RAMOS, J.; NAVARRO, J.C.; BROMAGE, N. (2001). Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture*. 194: 173-190.
- BALDISSEROTTO, B. 2002. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Rio Grande do Sul, Ed. UFSM. 212p.
- BEIRÃO, J.; SOARES, F.; HERRAEZ, M.P.; DINIS, M.T.; CABRITA, E. (2009) Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. *Theriogenology*. 72: 1251-1261.
- BEIRÃO, J.; CABRITA, E.; SOARES, F.; HERRAEZ, 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: 508-13.
- BELL, M.V.; DICK, J.R.; THRUSH, M.; NAVARRO, J.C. (1996). Decreased 20:4n - 6/20:5n - 3 ratio in sperm from cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, broodstock compared with wild fish. *Aquaculture*. 144: 189-199.

- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. et al. (1995). Sperm Physiology and Quality *in*: Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Eds. Bromage, N. R. and Roberts, R.J. Blackwell Science. 424p.
- BLÁZQUEZ, M.; BOSMA, P. T.; FRASER, E. J.; VAN LOOK, K. J. W.; TRUDEAU, V. L. (1998). Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comparative Biochemistry and Physiology (C)*. 119: 345-364.
- BOLE, J.; LABBÉ, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. Review. *General and comparative endocrinology*. 165: 535-548.
- BORGUETTI, J.R.; SILVA, U.A.T. (2008). Principais sistemas produtivos empregados comercialmente. *In*: Ostrensky, A.; Borghetti, A.J.R.; Soto, D. (eds) Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Organização das Nações Unidas para agricultura e Alimentação, Brasília, FAO. 93p.
- BOSCARDIN, N.R. (2008) A produção aquícola brasileira. *In*: Ostrensky A, Borghetti AJR, Soto D (eds) Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Organização das Nações Unidas para agricultura e Alimentação, Brasília, 27-73.
- BOMBARDELLI, R.A.; MIRSCHBACHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E.A.; SYPPERRECK, M.A. (2006). Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35: 1251-1257.
- BROOKS, S.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. (1997). Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 7: 387-416.
- BROMAGE, N.R. (1995). Broodstock management and seed quality-general considerations. *In*: Bromage, N.R.; Roberts, R.J. (Eds.). Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford, 1-24.
- 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: 967-75.

- CAPELETI, A.R.; PETRERE, J.R.M. (2006). Migration of the curimbatá *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) (PISCES, PROCHILODONTIDAE) at the waterfall “Cachoeira de Emas” of the Mogi Guaçu river- São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 66 (2B): 651-659.
- CASTAGNOLLI, N. (1992). Piscicultura de água doce. Jaboticabal: Funep, 189p.
- CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. (2004). Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A phylogenetic and revisionary study. *Smithsonian Contributions to Zoology*. 622: 1-189.
- CECCARELLI, P.S.; SENHORINI, J.A.; VOLPATO, G. (2000). Dicas em piscicultura - perguntas e respostas. Botucatu: Ed. Santana, 247p.
- CESTAROLLI, M.A.; PORTELLA, M.C. (1994). Larvicultura de peixes: uma abordagem em escala piloto. *Comunicação da Pesquisa Agropecuária*, São Paulo. Maio/agosto. 12 (2): 28-29.
- CHEREGUINI, O.; DE LA BANDA, I.G.; RASINES, I.; FERNANDEZ, A. (1999). Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. *Aquaculture Research*. 30: 319-324.
- CINQUETTI, R. (1994). Localization of steroidogenesis in the testis of *Padogobius martensi* (Pisces, Gobidae): histological, histochemical and ultrastructural investigation. *Bollettino di Zoologia*. 61: 309-315.
- CINQUETTI, R.; DRAMIS, L. (2003). Histological, histochemical and enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* (Pisces Gobidae) between breeding seasons. *Journal of Fish Biology*. 63 (6): 1402.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C. (1999). Ionic factors regulating the motility of fish sperm in: *The Male Gamete*. Chapter 16, 161-186.
- FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H.M.; NARAHARA, M.Y. (1984). The size composition of the eggs of curimbatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). *Aquaculture*, 42: 37-41.

- FURUYA, W.M. (2001). Espécies nativas. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. (Orgs). Fundamentos da moderna aquicultura. Editora ULBRA, Canoas, Brasil, 84-90.
- GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E.; CESTAROLLI, M.A.; NARAHARA, M.Y.; FENERICH-VERANI, N. (1984). Reprodução induzida de curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steind. 1881 sob condições de cultivo experimental. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, 8 (2): 113-119.
- GODINHO, H.P.; RIBEIRO, D.M. (1985). Maturidade sexual de curimatás, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Teleostei), em viveiros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 37 (4): 349-57.
- GODINHO, A.L.; KYNARD, B.; GODINHO, H.P. (2007). Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*. 80: 421-433.
- GRIER, H.; VAN DER HURK, R.; BILLARD, R. (1989). Cytological identification of cell types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. *Cell and Tissue Research*. 257, 491-496.
- GRIER, H.J. (1993). Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cells barrier. In: Russell, L.D.; Griswald, M.D. (Eds.), *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, 703-739.
- GRIER, H.J. (2002). The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Creswell, R.L. (Ed.). *Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, November 2000. Fort Pierce, Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium, 537-552.
- GRIER, H.J.; URIBE-ARANZÁBAL, M.C. (2009). The testis and spermatogenesis in teleosts, in: Jamieson, B. G. M. (Ed.), *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony fishes)*, *New Hampshire: Science Publishers*, Endfield, 119-142.
- HART, N.H.; DONOVAN, M. (1983). Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *Journal of Experimental Zoology*., New York, 227: 277-296.

- HENGSAWAT, K.; WARD, F.J.; JARURATJAMORN, P. (1997). The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture*. 152, 67-76.
- HOAR, W.S.; NAGAHAMA, Y. (1978). The cellular sources of sex steroids in the teleosts gonads. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 18: 893-898.
- HONJI, R.M. (2007). Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo de tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae), em três ambientes distintos: natural, impactado e cativo. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Biociências - USP. 228p.
- HOUSSAY, B.A. (1930). Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. *Revista de la Sociedad Argentina de Biología*. 6: 686-688.
- IBAMA. (2006). Senso Estrutural da pesca 2006. Brasil, coleta de dados e estimação de desembarque de pescado. Belém.
- IDLER, D.R.; SCHMIDT, P.J.; BIELY, J. (1961). The androgenic activity of 11-ketotestosterone: a steroid in salmon plasma. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 39:(2) 317-320.
- IHERING, R.V. (1935). Die wirkung von Hypophysehijektion auf den Laichakt von Fischen. *Zoologischer Anzeiger*. 111: 273-279.
- IZQUIERDO, M.S.; NDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A.G.J. (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*. 197: 25-42.
- JOHNSON, L.A. (2000). Lessons from the cryopreservation of livestock sperm In. Tiersch, T.R.; Mazik, P.M. (Eds.). Cryopreservation in aquatic species. Baton Rouge: *World Aquaculture Society*. 381-387.
- KAMEI, H.; KAWAZOE, I.; KANEKO, T.; AIDA, K. (2005). Purification of follicle-stimulating hormone from immature Japanese eel, *Anguilla japonica*, and its biochemical properties and steroidogenic activities. *General and Comparative Endocrinology*. 143: 257-266.

- KELLY, S.A.; HAVRILLA, C.M.; BRADY, T.D.; ABRAMO, K.H.; LEVIN, E.D., (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*. 106: 375-384.
- KJÖRSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOMEFJORD, I. (1990). Egg quality in marine fishes. *Advances In Marine Biology*. 26: 71-113.
- KOBAYASHI, W.; YAMAMOTO, T.S. (1981). Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *Journal of Experimental Zoology*. New York, 217: 265-275.
- KOWALTOWSKI, A.J.; DE SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 47: 333-343.
- LAALE, H.W. (1980). The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review. *Copeia*, Lawrence. 2: 210-226.
- LABBE, C.; MAISSE, G.; MULLER, K.; ZACHOWSKI, A.; KAUSHIK, S.; LOIR, M. (1995). Thermal acclimation and dietary lipids alter the composition, but not fluidity, of trout periplasma membrane. *Lipids*. 30, 23-33.
- LEATHERLAND, J.F.; CHO, C.Y. (1985). Effect of rearing density on thyroid and interrenal gland activity and plasma hepatic metabolite levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *Journal of Fish Biology*. 27: 583-592.
- 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.
- LOIR, M. (1990a). Trout steroidogenic testicular cells in primary culture. 2. Steroidogenic activity of interstitial cells Sertoli cells and spermatozoa. *General and Comparative Endocrinology*. 78: 388-398.
- LOIR, M. (1990b). Interstitial cells from the testis of the trout *Oncorhynchus mykiss* in vivo and in primary culture. *Cell and Tissue Research*. 261: 133-144.

- LOIR, M.; SOURDAINE, P.; MENDIS-HANDAGAMA, S.M.; JEGOU, B. (1995). Cell-cell interactions in the testes of teleosts and elasmobranchs. *Microscopy Research and Technique*. 6: 533-552.
- MALLASEN, M.; BARROS, H.P.; YAMASHITA, E.Y. (2008). Produção de peixes em tanques-rede e a qualidade de água. *Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária*, 47-51.
- MANSOUR, N.; LAHNSTEINER, F.; BERGER, B. (2004). Characterization of the testicular semen of the African catfish, *Claria gariepinus* (Burchell, 1822), and its short-term storage. *Aquatic Research*. 35: 232-244.
- MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAGAHAMA, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 5774-5778.
- 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.
- MYLONAS, C.C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 516-534.
- NAGAHAMA, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology*. 38: 217-229.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. (2000). Caracterização espermática, preservação criogênica e fertilidade do matrinhã, *Brycon cephalus* Gunther, 1860 (Teleostei, Characidae). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 47p.
- 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 Physiology and Biochemistry*. 35: 197-206.

- OHTA, T.; MIYAKE, H.; MIURA, C.; KAMEI, H.; AIDA, K.; MIURA, T. (2007). Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biology of Reproduction*. 77: 970-977.
- PARENTI, L.R.; GRIER, H. (2004). Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes. *Integrative and Comparative Biology*. 44: 333-348.
- PEREZ-CEREZALES, S.; MARTINEZ-PARAMO, S.; CABRITA, E.; MARTINEZ-PASTOR, F.; DE PAZ, P.; HERRAEZ, 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.; YU, K.L. (1997). Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basics applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 7: 173-197.
- PORTELLA, M.C.; VERANI, J.R.; CESTAROLLI, M.A. (2000a). Use of live and artificial diets enriched with several fatty acid sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings. Effects on survival and growth. *Journal of Aquaculture in the Tropics*. 15: 45-58.
- PORTELLA, M.C.; VERANI, J.R.; FERREIRA, T.J.B.; CARNEIRO, D.J. (2000b). Use of live and artificial diets enriched with several fatty acid sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings. 2. Effects on body composition. *Journal of Aquaculture in the Tropics*. 15: 185-197.
- PORTELLA, M.C.; VERANI, J.R.; CARNEIRO, D.J.; CESTAROLLI, M.A. (2000c). The feeding of *Prochilodus scrofa* larvae and fry - method of analysis based on the relative condition factor. *Boletim do Instituto de Pesca*. 26 (2): 9-15.
- PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. (1994). Manual de piscicultura tropical. Brasília: Ibama, 196p.
- PUDNEY, J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microscopy Research and Technique*. 32: 459-497.
- PUSTOWKA, C.; MCNIVEN, M.A.; RICHARDSON, G.F.; LALL, S.P. (2000). Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout

- Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. *Aquaculture Research*. 31: 297-305.
- REDDING, J.M; PATIÑO, R. (1993). Reproductive physiology. In: EVANS, D. H. *The Physiology of Fishes*. CRC Press, 503-534.
- REINBOTH, R.; BRUSLÉ-SICARD, S. (1997). Histological and ultrastructural studies on the effects of hCG on sex inversion in the protogynous teleost *Coris julis*. *Journal of Fish Biology*. 51: 738-749.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (2003). CLOFFSCA - The Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs. Porto Alegre, RS.
- RESENDE, E.K.; CATELLA, A.C.; NASCIMENTO, F.L.; PALMEIRAS, S.S.; PEREIRA, R.A.C.; LIMA, M.S.; ALMEIDA, V.L.L. (1995). Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul. Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP. *Boletim de Pesquisa*, 02: 75p.
- RIEHL, R. (1993). Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. *Microscopy and Analysis*, May, 29-31.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. (1993). Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces Characiformes). *European Archives of Biology*., Zutendall, 104: 1-6.
- RURANGWA, E.; ROELANTS, I.; HUYSKENS, G. et al. (1998). The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilisation ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*.53: 402–413.
- RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. et al. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234(1): 1-28.
- SCHULZ, R.W.; FRANÇA, L.R.; LAREYRE, J.J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NÓBREGA, R.H.; MIURA, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*. 165: 390-411.

- SHEN, H.; ONG, C. (2000) Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology & Medicine*. 28: 529-536.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; GODINHO, H.P.; YASUI, G.S. (2007). Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, 59(4): 877-882.
- STACEY, N. (2003). Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: 229-235.
- STREIT JR., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. (2004). Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*. 7: 157-162.
- VAZZOLER, A.E.A.M. (1996). Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. EDUEM, Maringá. 169p.
- VIVEIROS, A.T.M.; FESSEHAYE, Y.; TER VELD M.; SZULTZ R.W.; KOMEN J. (2002). Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 213: 373-386.
- WELTZIEN, F.A.; ANDERSSON, E.; ANDERSEN, O.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; NORBERG, B. (2004). The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 137: 447-477.
- WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. (1983). A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: Escopo. 220p. Tradução de Vera Lucia Mixtra Chama de "The Artificial Propagation of Warm - Water Fin fishes - A Manual for Extension".
- ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. (2007). Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, 31(3): 367-373.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O.; REYNALTE-TATAJE, D.A.; SERAFINI, R.L. (2009). Water pH and *Prochilodus lineatus* larvae survival. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35: 151-155.

## **CAPÍTULO II**

## **Processo de formação de espermatozoides e qualidade do sêmen de reprodutores de *Prochilodus lineatus* em tanques-rede e viveiros escavados.**

### *RESUMO*

A reprodução de peixes migradores nativos apesar de já apresentar relativo sucesso, ainda apresenta diversos obstáculos. Entre eles podemos destacar as variações nas taxas de fertilidade, eclosão e sobrevivência de larvas entre desovas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar de forma inédita se o manejo pode interferir neste processo em machos de *P. lineatus*. Os resultados mostraram que os machos mantidos em tanques-rede (TR) com água de baixa qualidade durante 18 meses apresentam encurtamento do ciclo reprodutivo; redução significativa no IGS e no diâmetro de túbulos seminíferos ( $p < 0,05$ ) quando comparados com machos mantidos em viveiros escavados (VE). A concentração espermática e as taxas de fertilidade obtidas com o sêmen dos machos de TR foram inferiores às obtidas com o sêmen dos machos em VE ( $p < 0,05$ ). Além disso, os espermatozoides de TR apresentaram maior frequência de danos de DNA, mesmo apresentando taxas similares de motilidade e sobrevivência que os de VE ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram de forma inédita que o manejo inadequado pode interferir na gametogênese e na qualidade de gametas masculinos nesta espécie. Além disso, demonstramos que práticas inadequadas de manejo podem prejudicar a função testicular ainda nos meses de inverno, muito antes dos meses de reprodução.

Palavras-chave: ciclo reprodutivo, sistema de produção, desenvolvimento testicular, reprodutores, características seminais.

**Process of formation of sperm and semen quality of *Prochilodus lineatus* male breeders in cages and earthen ponds.**

*ABSTRACT*

The reproduction of native migratory fish still presents several obstacles. Among them we can highlight the changes in fertility rates, hatching and survival of larvae among spawning. Thus, the objective of this study was to evaluate in an unprecedented way if the reproductive management can interfere in this process in males of *P. lineatus*. The results showed that males kept in cages (C) for 18 months have their reproductive cycle shortened; significant reduction in the GSI and in the diameter of seminiferous tubules ( $p < 0.05$ ) compared with males kept in earthen ponds (EP). The sperm concentration and fertility rates obtained with semen from males of Cs were lower than those obtained with semen EP ( $p < 0.05$ ). In addition, the sperm of males maintained in Cs had higher frequency of DNA damage, even with similar rates of survival and motility of the EPs ( $p < 0.05$ ). The results showed by unprecedented manner that the improper management can interfere with gametogenesis and quality of male gametes in this species. Furthermore, we demonstrate inadequate management practices can affect the testicular development even in the winter months, long before the breeding season.

Keywords: reproductive cycle, production system, testicular development, broodstocks, semen characteristics.

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de técnicas de indução a reprodução de peixes migradores permitiu um notável incremento qualitativo na piscicultura destas espécies, possibilitando a produção em cativeiro de alevinos destinados ao cultivo (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). No entanto, observações a campo mostram claramente a frequente ocorrência de resultados inadequados e/ou insuficientes obtidos com a reprodução induzida por hormônios.

Com relação aos reprodutores machos das espécies migradoras nativas, não foram encontrados relatos na literatura sobre o efeito do manejo na qualidade e quantidade do sêmen produzido, como também, sobre o efeito do uso deste sêmen nas taxas de fertilidade dos ovócitos e eclosão de larvas. Normalmente, no momento da reprodução induzida, utiliza-se o sêmen disponível, considerando-se que este é, sempre, de boa qualidade. Em contrapartida, fortes evidências indicam que cuidados com o sêmen e com os espermatozoides podem elevar significativamente o sucesso da reprodução induzida de espécies nativas. Como exemplo, pode-se citar a piabanha, *Brycon insignis*, espécie na qual foi demonstrado que apenas definindo-se a razão adequada entre número de espermatozoides para cada ovócito, no momento da fecundação, é possível elevar a porcentagem de fecundação de 35,7 para 93,4% (Shimoda *et al.*, 2007).

Ainda neste contexto, um outro aspecto a ser considerado é a variação da concentração espermática no sêmen, encontrada nos distintos machos de um mesmo plantel, fator que raramente é considerado em estações de produção de alevinos. No suruvi, *Steindachneridion scripta*, após hipofisação, a variação espermática entre os machos de um plantel foi de 19,5 e 120,1 x10<sup>3</sup> espermatozoides/ mL (Luz *et al.*, 2001). No entanto, o motivo de tal variação é desconhecido, podendo até ser uma característica

da espécie. Um outro importante fator é a presença de uma considerável proporção de espermatozoides mortos no sêmen (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001), ou com anormalidades (Bombardelli *et al.*, 2006), ou com distintas taxas de motilidade (Ferreira *et al.*, 2001). É importante ressaltar que estas características só são detectadas microscopicamente, com auxílio de técnicas específicas (Bombardelli *et al.*, 2006), e frequentemente passam totalmente despercebidas em estações de produção de alevinos.

Estas flutuações das características seminais, descritas na literatura para várias espécies nativas, permitem inferir também que possivelmente as práticas de manejo aplicadas aos reprodutores machos possam interferir nas características seminais e nos resultados da reprodução induzida destas espécies. É sabido que fatores como estresse podem induzir apoptose (morte celular) nos ovócitos em desenvolvimento nas fêmeas (Brooks *et al.*, 1997), e que baixos níveis de oxigênio interferem negativamente nas taxas de fertilidade, eclosão e sobrevivência de larvas no pacu (Dabrowsky e Richard, 2003). Desta forma, o manejo aplicado aos reprodutores machos de espécies nativas pode estar interferindo, de forma imperceptível e até negativa, na qualidade do sêmen e no resultado da reprodução induzida destas espécies.

O processo de formação de espermatozoides em peixes é relativamente rápido quando comparado ao de mamíferos (Leal *et al.*, 2009; Nóbrega *et al.*, 2009). No zebra fish (*Brachydanio rerio*), espécie de peixe modelo mais bem estudada, a duração combinada das fases espermiogênica e meiótica é apenas de seis dias (Leal *et al.*, 2009), similar ao tempo descrito para a *Colisa fasciata* (Sinha *et al.*, 1979), enquanto que o período mais longo descrito foi de três semanas para a *Poecelia sphenops* (De Felice *et al.*, 1969). Em geral, em peixes, as células germinativas passam rapidamente pelas fases espermiogênica e meiótica, o que torna muito rápido o tempo necessário para se produzir um espermatozoide (Nóbrega *et al.*, 2009). Desta forma, nas espécies

migradoras, os espermatozoides permanecem por longos períodos estocados no interior das gônadas, uma vez que os mesmos começam a ser produzidos ainda nos meses de inverno (Grier e Taylor, 1998; Brown-Peterson *et al.*, 2002; Batlouni *et al.*, 2006), para serem liberados apenas no fim do ano, na curta estação de desova. Desta forma é razoável supor que as condições de manejo aplicadas aos reprodutores ao longo do ano (densidade de estocagem, nutrição, vazão, temperatura, níveis de oxigênio dissolvido, e outros) também devem interferir na qualidade do sêmen e dos espermatozoides (volume do sêmen, concentração espermática, taxas de sobrevivência, mal-formações e outros), e conseqüentemente na sua capacidade de fertilizar os ovócitos, principalmente com relação aos espermatozoides estocados há mais tempo nos testículos.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente o desempenho reprodutivo de reprodutores machos de curimatá (*P. lineatus*) mantidos em tanques-rede e viveiros escavados. Os reprodutores foram avaliados quanto ao processo anual de formação e estocagem de espermatozoides; como também sobre as taxas de eclosão de larvas e fertilidade de ovócitos fecundados com o sêmen proveniente dos dois tratamentos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Espécimes de curimatá, machos e fêmeas, com 12 meses de idade, comprimento total de  $31,48 \pm 1,03$  cm e peso corporal médio de  $394,85 \pm 29,85$  g, obtidos e estocados no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), foram distribuídos aleatoriamente em viveiros escavados (VEs) (n=4) com  $50\text{m}^3$  e tanques-rede (TRs) (n=4) com  $6\text{m}^3$ . Em cada VE e TR foram estocados cinquenta e cem espécimes, respectivamente, e destes foram feitas biometrias e coletas bimestralmente. Os animais submetidos à reprodução induzida não foram manipulados durante todo o experimento, pois foram escolhidos

aleatoriamente para os experimentos de análise de sêmen e de reprodução induzida. Nos dois sistemas de criação, os peixes tinham acesso ao fundo do viveiro, a entrada de água situava-se a aproximadamente 1,0 m do nível da água e a saída de água situava-se ao fundo do viveiro, do lado oposto à entrada, garantindo renovação constante.

## ***2.2 Condições de cultivo***

Durante o experimento, os peixes foram arraçoados seis (06) dias na semana, em duas porções, às 8:00 e às 17:00 horas, com ração comercial extrusada para peixes onívoros (composição: 10,0% de teor de umidade; 28,0% de proteína bruta, 5,0% de extrato etéreo, 7,0% de fibra, 10,0% de cinzas, 1,2% de Cálcio, 0,6% de fósforo), totalizando 3% de biomassa do plantel dia, calculado e reajustado a cada biometria. A ração administrada foi oferecida a lanço, possibilitando maior dispersão e, conseqüentemente, maior utilização da mesma. Os parâmetros da água foram medidos semanalmente usando um oxímetro YSI modelo 55 e uma sonda multiparâmetro YSI modelo 63 (Yellow Spring Instruments, Yellow Springs, OH, EUA) para determinar o oxigênio dissolvido, pH e níveis de condutividade. Com o auxílio de um disco de Secchi foi aferido, semanalmente as 09:00 horas, a transparência. A concentração de amônia foi determinada de acordo com o método de Solorzano (1969), com auxílio de um espectrofotômetro, Hach DR 2000, determinando pelo método colorimétrico a porcentagem de absorbância.

## ***2.3 Biometrias***

Os peixes foram mantidos nestas condições por um período de 440 dias, no qual 80 dias foram para aclimatação e 360 dias para o experimento. A alimentação dos peixes foi suspensa por um período de 24h antes da captura dos exemplares de cada sistema (VE e TR). As biometrias dos animais foram realizadas a cada 60 dias

(bimestralmente) no mesmo dia da coleta das amostras. Para as biometrias foram capturadas 30 peixes do VE, por rede de arrasto, e 30 peixes do TR, por meio de puçá. Apenas um TR e um VE foram utilizados em cada amostragem para evitar o manejo excessivo dos espécimes, de modo que os reprodutores fossem manipulados apenas a cada seis meses. Posteriormente, os animais ficaram acondicionados em caixas de fibra de vidro (1000 L) e, em seguida, foram anestesiados com benzocaína (etilaminobenzoato) na proporção de 3,0 g (diluída em 150 mL de álcool 96,0°GL) em 20 L de água para o registro de comprimento total (cm) e peso corporal (g). A cada biometria foram sacrificados (após anestesia letal) 5 machos dos 30 exemplares capturados em cada sistema de criação. Estes animais tiveram o sangue coletado para análise de esteroides e suas gônadas foram coletadas para cálculo de índices e para análises histológicas. Os Protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética e Bem-Estar de Animais (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

#### ***2.4 Parâmetros físicos e químicos da água***

Diariamente foram mensurados os valores de temperatura da água (máxima e mínima); oxigênio dissolvido e pH. Uma vez por semana, foram obtidos os valores da concentração do teor de amônia e transparência da água dos viveiros, através da imersão do Disco de Secchi. Nos tanques-rede foi aferido o teor de amônia interno do ambiente.

#### ***2.5 Determinação do fator de condição***

Foi fixado o coeficiente “b” da relação peso e comprimento do indivíduo, como  $b=3$ , definido como o coeficiente de alometria e, portanto, associado ao tipo de crescimento, aplicado na avaliação do “índice do bem-estar” também denominado de

Fator de condição (K) (Le Cren, 1951). Esse fator foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Fator de condição (K)} = \frac{\text{peso do indivíduo (Kg)}}{\text{comprimento do indivíduo (cm)}^b}$$

, onde  $b=3$ .

## ***2.6 Determinação do valor de IGS***

Esses índices foram calculados através dos valores encontrados em cada biometria bimestral, com os pesos obtidos das gônadas e o peso corporal do reprodutor, os índices foram calculados através da expressão abaixo. Todos os pesos foram registrados em gramas para cálculo dos índices.

$$\text{Índice gonadossomático (IGS)} = \frac{\text{peso das gonadas (g)}}{\text{peso do indivíduo (g)}} \times 100$$

## ***2.7 Avaliação histológica dos testículos***

Dos 5 reprodutores machos capturados a cada biometria para cada sistema, os testículos foram coletados, pesados e dos mesmos foram retiradas amostras transversais das regiões cranial, média e caudal; e então, foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas. Em seguida, foram lavadas em álcool 70%, para prosseguir com as técnicas histológicas de rotina para microscopia de luz com inclusão em paraplast, obtendo cortes com espessura de 5 $\mu$ m, e corados com Hematoxilina-Eosina. Com as secções histológicas foram feitas capturas de imagens utilizando objetiva de 40x, com o auxílio de uma câmera digital DP-11 (Olympus®) acoplados a um microscópio óptico Olympus BX-41 (Olympus®, Japão), e para auxiliar na morfometria foi utilizado o software Image Pro Plus 4.1.

Os testículos dos peixes dos VEs e TRs foram comparativamente avaliados quanto a evolução do processo espermatogênico ao longo das coletas. Para isso, os

parâmetros testiculares foram avaliados de acordo com a metodologia empregada por De Alvarenga e França (2009), com algumas modificações. De cada testículo (n=10) foram computados o diâmetro médio dos túbulos seminíferos (60 túbulos foram medidos). Foi avaliada a cada coleta, a ocorrência de cada tipo celular germinativo em 60 secções transversais de túbulos seminíferos por peixe (n=10). A partir desses dados foi computada a ocorrência de túbulos com apenas espermatogônias, cisto de espermatogônias, espermatócitos primários ou secundários, cisto de espermátides e espermatozoides no lúmen. A cada coleta foi registrada, em 60 secções transversais de túbulos seminíferos, a ocorrência de epitélio germinativo contínuo ou descontínuo (n=10). Os animais com túbulos seminíferos apresentando o epitélio germinativo descontínuo foram registrados para o cálculo da frequência.

## ***2.8 Análise de esteroides***

A quantificação foi feita por meio de amostras de sangue, retiradas por punção da veia caudal dos animais devidamente anestesiados com benzocaina, utilizando agulhas e seringas previamente heparinizadas. Em seguida, separaram-se alíquotas de plasma, por meio de centrifugação do sangue a 3000 rpm por 10 minutos, e a partir destas, foi feita a dosagem dos andrógenos por Elisaimunoensaio (ELISA), utilizando “11-Keto Testosterone EIA Kit” da Cayman Chemicals® e “Testosterone Kit” da InterKit® para dosar 11-KT e T, respectivamente. A leitura das placas foi realizada em leitora de microplaca (Tecan – Sunrime™ - Absorbance Reader) a um comprimento de onda de 450 nanômetros (nm) para o hormônio testosterona e 405 (nm) para 11-cetotestosterona. A validação dos ensaios hormonais do presente estudo foi realizada através de ensaios de validação para coeficiente de variação intraensaio conforme descrito por Moreira (1999).

## **2.9 *Análise de sêmen***

Ao final do primeiro estágio do estudo, dezoito e dezenove reprodutores de cada tratamento (VE e TR, respectivamente), que apresentaram liberação de sêmen por pressão abdominal no respectivo sistema de produção, foram separados e levados ao laboratório, onde ficaram em caixas de água de 1000 litros com aeração e renovação constante, a uma temperatura média de 27,2 °C. Com estes animais devidamente aclimatados, foi realizada a indução hormonal, com 0,6 mg de extrato bruto de hipófise de carpa por kg de peso vivo. Decorridos aproximadamente 7 horas da aplicação do hormônio, o desempenho dos machos criados nos dois distintos sistemas foi avaliado através, primeiramente, do volume de sêmen após a indução hormonal, com auxílio de um tubo falcon graduado.

O tempo de motilidade dos espermatozoides foi calculado com auxílio de um cronômetro estimando o tempo de permanência da atividade de, aproximadamente, 50% dos espermatozoides ativados. Para isso, 1 µL do sêmen coletado foi aplicado em uma lâmina de vidro, posteriormente, foi adicionado 20 mL de água para a ativação dos mesmos e, concomitantemente, o cronometro foi disparado. Com o auxílio de uma objetiva de 40x foi possível registrar os tempos para comparação dos dois tratamentos. Esse procedimento foi realizado para cada reprodutor pelo menos três vezes. A concentração espermática foi calculada em câmara hematimétrica de Neubauer. Para a mensuração da concentração espermática foi utilizada uma amostra conhecida de sêmen, diluído em um volume conhecido do fixador formol salino tamponado. As amostras foram homogeneizadas para posterior preenchimento da câmara. A contagem foi realizada em objetiva de 40x, onde foi realizada contagem nos dois lados da câmara (10 quadrados por quadrante). A avaliação do índice de sobrevivência espermática foi realizada a partir do método de coloração com eosina-nigrosina. Foram utilizados cerca

de 1  $\mu\text{L}$  de sêmen e 3  $\mu\text{L}$  da mistura dos corantes (eosina 5% e nigrosina 10%) para a realização dos esfregaços em lâminas de vidro. Após o processamento das lâminas, o material foi analisado em microscópio de luz em objetiva de 40x, onde foram avaliados 200 espermatozoides por amostra. Nesta técnica, as células mortas se apresentaram rosadas, devido à absorção dos corantes, e as vivas ficaram brancas, por serem impermeáveis aos corantes (Bombardelli *et al.*, 2006).

### **2.10 Ensaio cometa**

Para detectar rupturas de ligamentos de DNA foi utilizada a eletroforese em gel de célula única, comumente conhecida por ensaio cometa (Östling e Johanson, 1984). Amostras de sêmen (n=4 machos por tratamento) foram coletadas com auxílio de tubos falcon após a aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (0,6 mg/kg). Separados em duas alíquotas: a primeira para estimar a concentração espermática, já que um número adequado de espermatozoides garante melhor visualização, evitando sobreposição; e a outra foi separada, refrigerada e protegida da luz e, então, foi utilizada para o ensaio cometa. Amostras foram diluídas em solução salina tamponada (8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,15 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, 1000 mL de água destilada) a uma concentração de  $10,0 \times 10^6$  por mL. Todas as amostras foram avaliadas antes do ensaio cometa para garantir que os espermatozoides não haviam sido ativados.

A metodologia aplicada foi semelhante à utilizada por Cabrita *et al.* (2005) com modificações. Lâminas foram preparadas com uma primeira camada fina de agarose (100 $\mu\text{l}$  - agarose com ponto de fusão normal - Sigma, USA), para isso, elas foram submersas na solução de agarose e o excesso foi removido. A primeira solução de agarose foi feita pela dissolução, por aquecimento, da agarose 0,5% em água deionizada. A segunda camada de agarose foi realizada utilizando 243  $\mu\text{L}$  de uma segunda solução de agarose com baixo ponto de fusão (Sigma, USA), usando a mesma

metodologia descrita para a primeira solução, adicionado a 27  $\mu\text{L}$  de cada eluição dos espermatozoides em um micro tubo (Eppendorf, livre de RNase e DNase). Desta suspensão espermática 85  $\mu\text{L}$  foi utilizado para cobrir a primeira camada de agarose e, em seguida, foi aplicada uma lamínula até a solidificação (a 4°C por 15 minutos) e, então, foi removida. Todas as amostras de sêmen foram feitas em triplicatas.

A solução de lise foi preparada, com antecedência, com água destilada e deionizada. As lâminas, foram dispostas em cubeta vertical, cobertas com solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 e 1% N-Lauroil-sarcosinato) e mantidas imersas por no mínimo uma hora a 4°C. As lâminas foram imersas por mais uma hora a 4°C, na solução de lise com a adição de “*dithiothreitol*” a uma concentração final de 10 mM, para descondensar o DNA. Posteriormente, as lâminas foram mantidas por mais 90 minutos, a 4°C, na solução com a adição do “*diiodosalicylate*” a uma concentração final de 4 mM.

Ao término, as lâminas foram retiradas da solução, e acomodadas em uma cuba de eletroforese horizontal preenchida com solução de eletroforese (0,3 M NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH >13), mantidas por 20 minutos a 4°C. A eletroforese foi conduzida por 20 minutos a 25 V e 300 mA a 4°C. Após este processo as lâminas foram cobertas com solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos (3x) e, então, as lâminas foram secas e fixadas, por imersão, em etanol absoluto gelado por 5 minutos, e acondicionadas em caixas protegidas de luz e poeira.

Para o processo de coloração foi utilizado 50  $\mu\text{L}$  de solução GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) diluídos em 3000 mL de água Milli-Q. As imagens foram adquiridas, com objetiva de 40x, com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica DM 5000 B) acoplada a uma câmera digital (Leica FX DFC300) e salvos como

arquivos digitais para posterior análise, usando software Leica Application Suite (LAS V2.7.1) para documentação.

Um total de 100 células foi contado para cada amostra, as imagens capturadas foram usadas para determinar o comprimento do cometa usando uma escala de 0-4 (Green *et al.*, 1996). Com isso 100 cometas aleatórios, excetuando os das bordas das lâminas, analisados em duas lâminas, foram classificados visualmente em cinco classes, de acordo com a fragmentação de DNA, denominadas de Classe 0 a Classe 4, onde a Classe 0 representava ausência de danos e a Classe 4 o máximo de danos.

A porcentagem de classes de dano foi calculada como a porcentagem de ocorrência de cada classe (classe 0 a 4) em relação ao total de cometas contados:

$$\text{Classe de danos (\%)} = ((n^\circ \text{ da Classe}) \times 100) / (n^\circ \text{ total}).$$

O Índice de Danos (ID) foi calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe (0, 1, 2, 3 e 4). Então, o índice de danos total de 100 cometas poderia variar de 0 (todos sem danos) ao máximo de 400 (todos danificados).

$$\text{ID total} = 0.(n \text{ Classe } 0) + 1.(n \text{ Classe } 1) + 2.(n \text{ Classe } 2) + 3.(n \text{ Classe } 3) + 4.(n \text{ Classe } 4).$$

### ***2.11 Reprodução induzida e desenvolvimento embrionário***

Machos dos dois tratamentos (n=4 em cada), que se mostraram aptos à indução hormonal (liberação de sêmen ante massagem abdominal), foram hormonalmente induzidos com hipófise de carpa seguindo protocolo de rotina de reprodução induzida (Cecarelli *et al.*, 2000; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). Do sêmen obtido dos machos de cada tratamento foi obtido um “pool” que foi utilizado para fecundar um “pool de ovócitos” de fêmeas de curimatá mantidas em VE (n=4) extrusadas no mesmo momento. Foram utilizadas apenas fêmeas mantidas em VE para garantir

ovócitos saudáveis resultando na variação apenas entre os machos dos dois tratamentos. Os ovócitos fecundados foram então colocados em 8 incubadoras (2 tratamentos x 4 repetições) com capacidade de 3 litros (50g de ovócitos por incubadora). Foi contado o número total de ovos fecundados e hidratados em amostras de um grama de ovócitos de cada fêmea, estimando assim, o número de ovos colocados em cada incubadora.

As taxas de fertilidade (cinco horas pós fertilização) e de eclosão (14 horas pós fertilização) foram comparadas entre os ovócitos fecundados com sêmen obtido dos machos mantidos nos dois sistemas de criação (VE e TR).

## ***2.12 Análise estatística***

Quando pertinente, os valores médios obtidos como, por exemplo, os parâmetros seminais, as taxas de fertilização de ovócitos e os índices reprodutivos foram calculados através do teste “t”, para os tratamentos no mesmo bimestre; e análise de variância (ANOVA) ao longo do tempo para o mesmo tratamento, sendo estimadas as médias, desvios padrões e erros padrões da média. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Testes de normalidade e homocedasticidade das variâncias foram realizados, assim como transformações, quando necessárias. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa Statistica (Copyright© StatSoft, version 7.0).

## **3 RESULTADOS**

### ***3.1 Parâmetros físicos e químicos da água***

Os dados médios obtidos para VEs e TRs foram: pH ( $7,7 \pm 0,4$ ;  $7,6 \pm 0,8$ ), oxigênio dissolvido ( $3,8 \pm 1,6$ ;  $2,0 \pm 1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), condutividade ( $69,3 \pm 15,9$ ;  $76,2 \pm 9,4 \text{ } \mu\text{S.cm}^{-1}$ ), transparência ( $68,3 \pm 1,8$  e  $60,0 \pm 1,2 \text{ cm}$ ), amônia ( $129,8 \pm 80,8$ ;  $248,5 \pm 119,0 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e temperatura ( $23,2 \pm 3,1$ ;  $23,2 \pm 2,7 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) (Fig. 1).

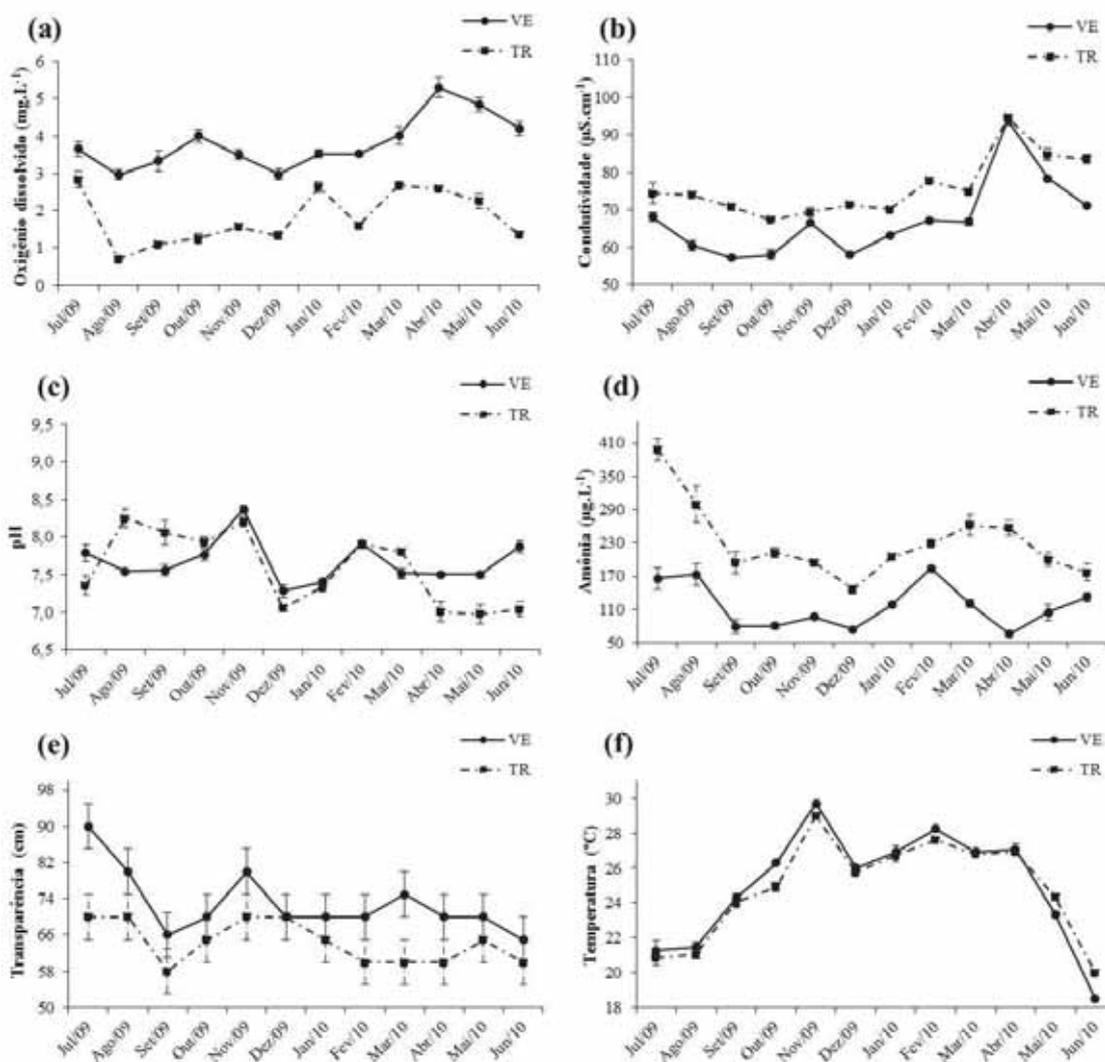


Figura 1. (a-f) Valores médios mensais com os respectivos erros padrão (mínimo e máximo) das características da água nos viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR), correspondentes ao período de manança dos animais representados por: (a) oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), (b) condutividade ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ), (c) pH, (d) amônia ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), (e) transparência (cm) e (f) temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2 Características gerais dos reprodutores

Com exceção da primeira coleta, a média de peso foi significativamente maior para os animais mantidos em VEs do que em TRs ( $p < 0,05$ ) (Fig. 2a). Ainda com relação aos reprodutores mantidos nos VEs, os pesos médios em todas as biometrias sempre foram maiores que 400g, ou seja, a média de peso obtido na primeira coleta ( $398,67 \pm 18,56\text{g}$ ), não reduziu ao longo do tratamento. Por outro lado, nos animais mantidos em

TRs, com exceção a segunda coleta (382,00 ± 40,22), o peso das demais foi sempre inferior ao peso inicial (343,00 ± 23,23) (Fig. 2a). No período de Jan-Fev/10 foi observado um ápice da média dos pesos nos reprodutores dos VEs (496,20 ± 35,68g), se confrontando com a média mais baixa dos animais em TRs (229,80 ± 7,39) (Fig. 2a).

Os valores médios de K dos peixes dos VEs foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) àqueles dos de TRs durante todo o período experimental, exceto no início do período reprodutivo (Nov-Dez/09) e após o término (Mar-Abr/10). A diferença se acentuou no período reprodutivo (Jan-Fev/10), quando o K médio dos machos de TR caiu de forma mais pronunciada (0,09 ± 0,02), porém não significativa entre as coletas do mesmo grupo, enquanto que nos animais mantidos em VEs o valor se manteve (0,13 ± 0,04) (Fig. 2b).

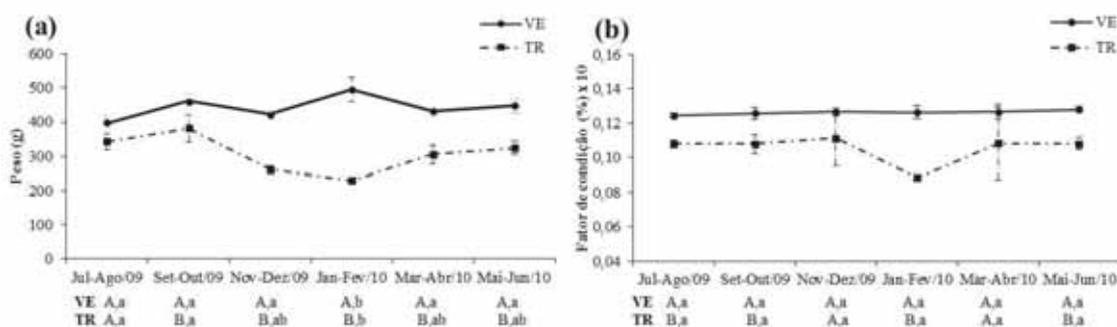


Figura 2. (a-b) Valores médios de: (a) peso (g) e (b) fator de condição (%), de *P. lineatus*, ao longo do ano, em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR). Letras sobreescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ ), enquanto as minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os bimestres ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Estrutura testicular

Os testículos de *P. lineatus* são órgãos pares dispostos paralelamente à bexiga natatória, se fundem na região posterior das gônadas e ficam aderidos em toda sua extensão à cavidade pelo mesórquio, formado principalmente por gordura perigonadal (Fig. 3). O testículo apresenta uma região voltada ao dorso do animal, onde é situado o ducto testicular principal, e outra voltada ao ventre. Na região dos testículos voltada ao

dorso ficam evidentes, quando estão maduros, os vasos sanguíneos, e na região voltada ao ventre o testículo fica livre, ou seja, sem tecido de sustentação (Fig. 3).

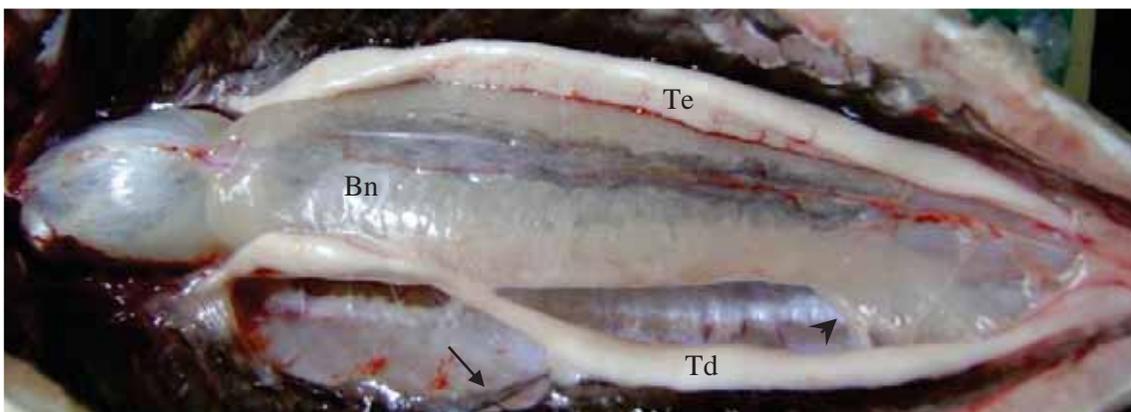


Figura 3. Vista da disposição dos testículos de machos de curimatá (*P. lineatus*). Assinalados: mesórcio (seta); tecido adiposo de sustentação (ponta de seta); testículo direito (Td); testículo esquerdo (Te); Bexiga natatória (Bn).

### 3.4 Desenvolvimento testicular: valores de IGS

Desde a segunda coleta (Set-Out/09), os valores de IGS, em animais mantidos em VEs, apresentaram uma ligeira tendência a ser maior do que em animais mantidos em TRs, o que foi confirmado na terceira coleta e mantido até o final do experimento ( $p < 0,05$ ) (Fig. 4). A maior diferença entre os tratamentos foi na época de reprodução (Nov-Dez 09) quando os valores de VEs foram mais de 2,5 vezes maior do que os dos TRs. Os valores de IGS em animais mantidos em VEs aumentaram progressivamente a partir da primeira (Jul-Ago/09) à terceira coleta (Nov-Dez/09), quando atingiram um pico ( $\sim 1,3\%$  do peso corporal) (Fig. 4). Na quinta coleta (Mar-Abr/10), os valores diminuiram drasticamente para cerca de  $0,4\%$  ( $p < 0,05$ ), mostrando que entre a terceira e quinta coleta (final do verão/ início do outono), o período reprodutivo terminou para animais em VEs, que entraram na fase de regressão (Fig. 4). Em contraste, os valores de IGS dos animais em TRs só aumentaram entre a primeira e a segunda coleta (de Jul-Ago/09 a Set-Out/09) ( $p < 0,05$ ), estabilizando perto de  $0,5\%$  em Nov-Dez/09 e diminuindo a aproximadamente  $0,05\%$  na última coleta (Fig. 4).

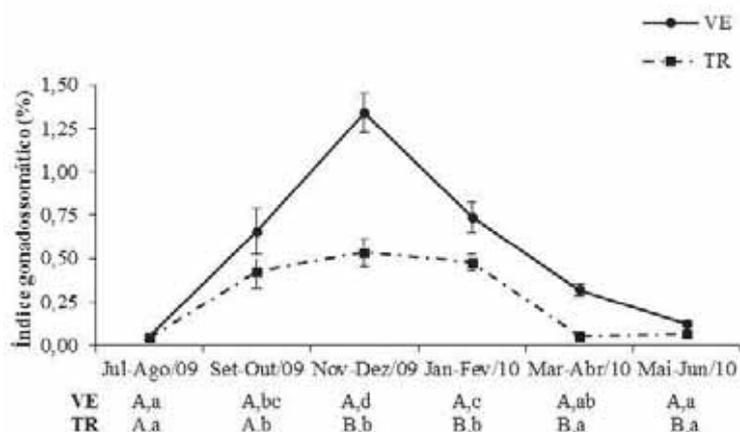


Figura 4. Índice gonadosomático dos animais mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR) ao longo do ano. Letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ ), enquanto as minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os bimestres ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Histomorfometria dos testículos

Na primeira coleta (Jul-Ago/09 - inverno - início da fase de maturação), 80 dias após o início do período experimental, o perfil dos túbulos seminíferos dos animais em VEs e TRs foi diferente (Figs. 5a e 5d; 6a-b). Durante este período, tais diferenças ainda sutis, não refletiram em seus valores de IGS, que eram muito similares em ambos os grupos neste período (Fig. 4). A análise histomorfométrica revelou que ~75% dos túbulos computados, baseados na presença de células germinativas, de animais em TRs continha apenas espermatogônias (sem fases meióticas e espermiogênica), enquanto em VEs este tipo de túbulo correspondeu a ~16% ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5a). Túbulos contendo células germinativas, além das fases meióticas e espermiogênicas, apresentaram frequências semelhantes entre os tratamentos, exceto para a maior frequência de túbulos contendo espermátides em VEs do que em TRs (Fig. 5b-e). Neste período, não foi possível determinar a frequência de EGD, por não haver presença de lúmen nos túbulos seminíferos dos animais mantidos em TRs (Figs. 5f e 6b). O diâmetro médio dos

túbulos seminíferos (~ 50  $\mu$ m) (Fig. 7) foi semelhante entre os tratamentos durante esse período ( $p < 0,05$ ).

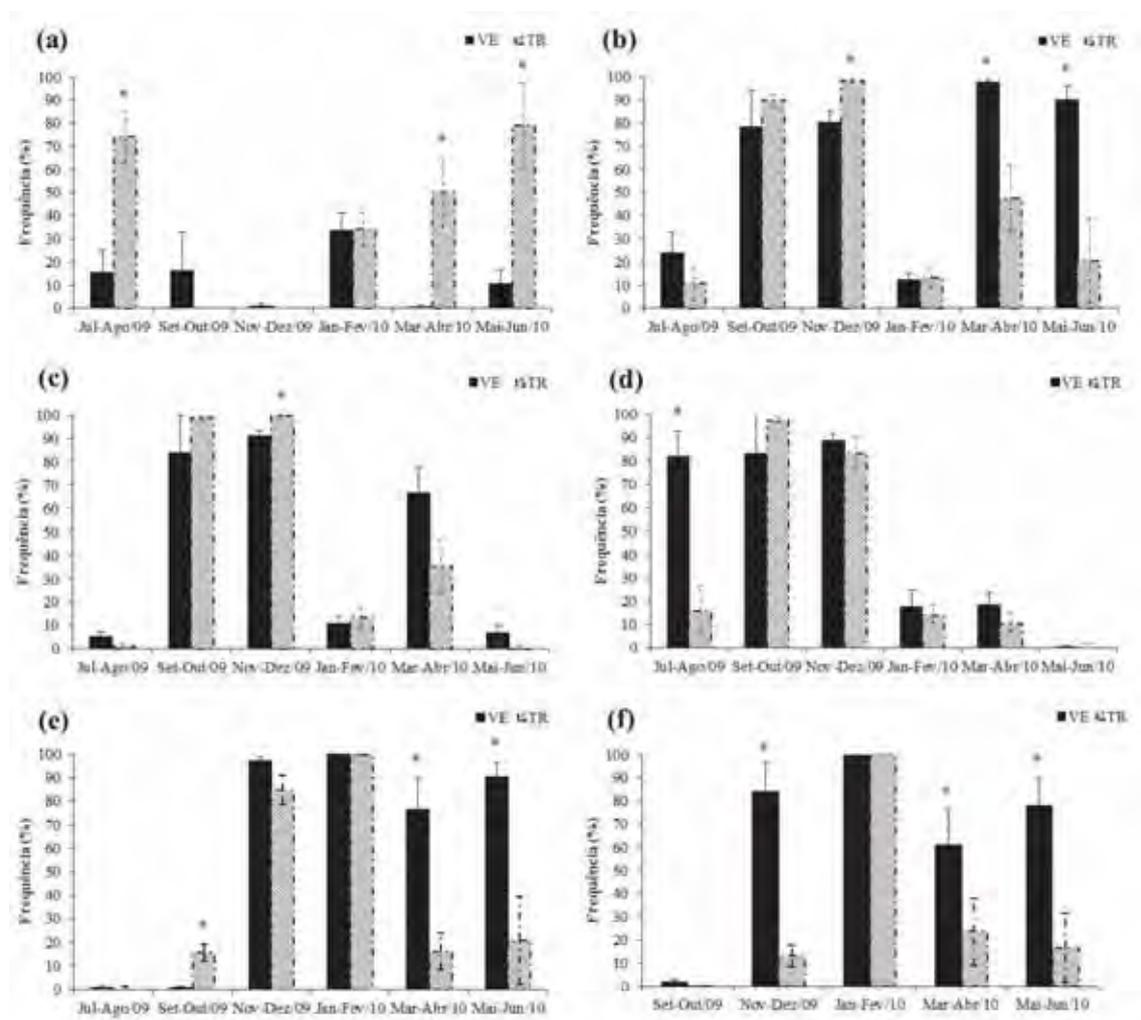


Figura 5. (a-f) Frequência dos distintos tipos de túbulos seminíferos, baseado na presença dos diferentes tipos celulares germinativos, nos testículos de machos mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR). (a) Apenas espermatogônias; (b) cisto de espermatogônias; (c) cisto de espermatócitos primários ou secundários; (d) cisto de espermátides; (e) espermatozoides no lúmen; e (f) frequência de túbulos com epitélio germinativo descontínuo. Asteriscos indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ ).

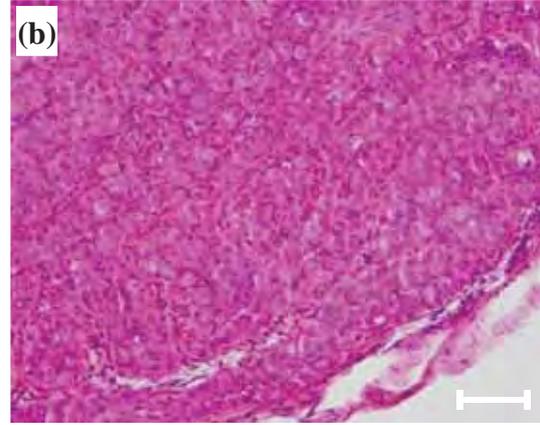
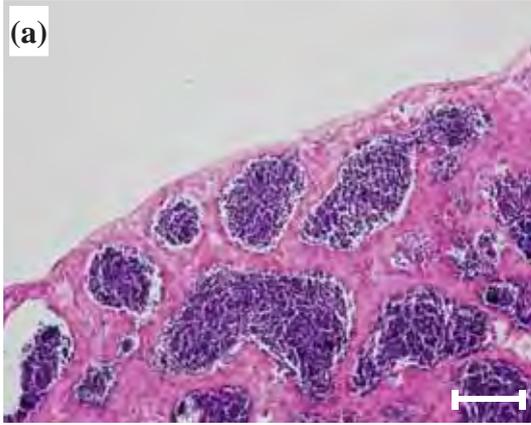
Na segunda coleta (Set-Out/09 - início da primavera - fase de maturação), as frequências percentuais de diferentes tipos de túbulos seminíferos tornaram-se semelhante entre os grupos (Figs. 5a-d). No entanto, durante este período os valores médios de IGS (Fig. 4) e diâmetro tubular (Figs. 6c-d e 7) aumentaram mais intensamente em animais mantidos em VEs do que nos mantidos em TRs.

Na terceira coleta (Nov-Dez/09 - verão - época de reprodução) túbulos seminíferos contendo apenas espermatogônias não eram mais vistos (Figs. 5a, 6e-f) predominando cistos contendo células meióticas e espermiogênica, em ambos os grupos (Fig. 5b-d). Durante este período, em ambos os grupos, o diâmetro dos túbulos seminíferos manteve-se estável em comparação com a coleta anterior, mas foi ~ 1,3 vezes maior em VEs comparados aos animais em TRs ( $p < 0,05$ ) (Fig. 7). As características do revestimento do epitélio germinativo desses túbulos também foram diferentes entre os grupos, a frequência dos túbulos revestidas por EGD em machos mantidos em VEs (~ 82%) foi quase 7 vezes maior do que em machos nos TRs (~ 12%) (Fig. 5f), mostrando que os testículos foram mudando a sua função principal de produzir espermatozoides para armazenamento dos mesmos (Fig. 6e-f), que também pode ser notado por uma menor frequência de túbulos contendo células germinativas em meiose comparada com a de TRs ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5c). A maior quantidade de espermatozoides armazenados em testículos de machos mantidos em VEs (Fig. 6e) contribuíram com o aumento ~ 2,5 vezes maior nos valores médios IGS neste grupo (Fig. 4), em comparação com os de TRs neste período.

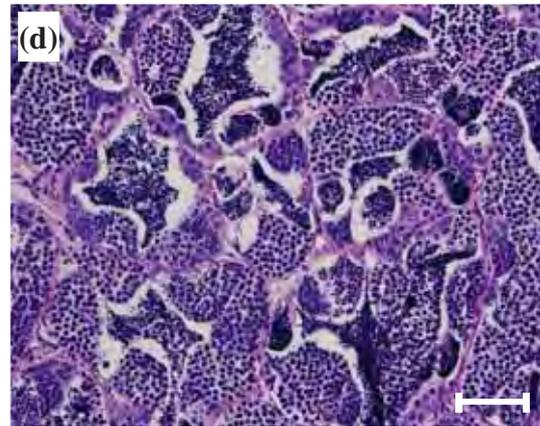
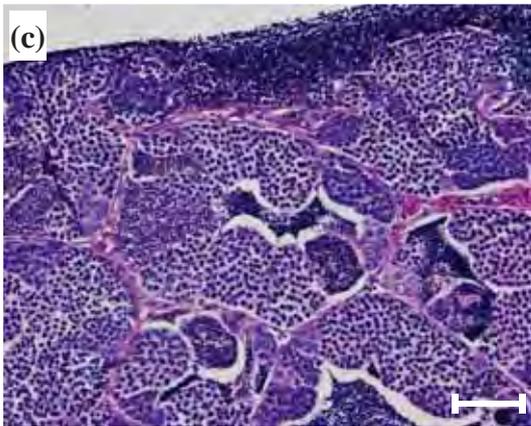
**Viveiro Escavado**

**Tanque Rede**

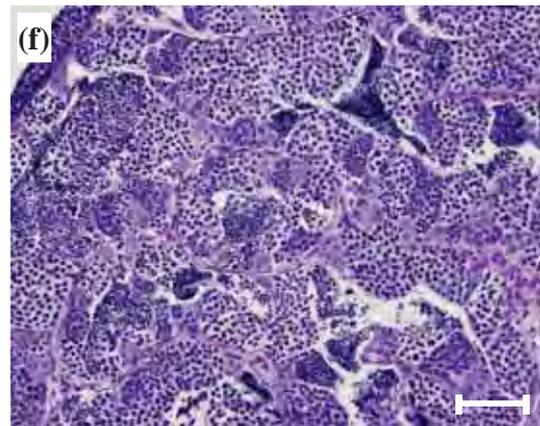
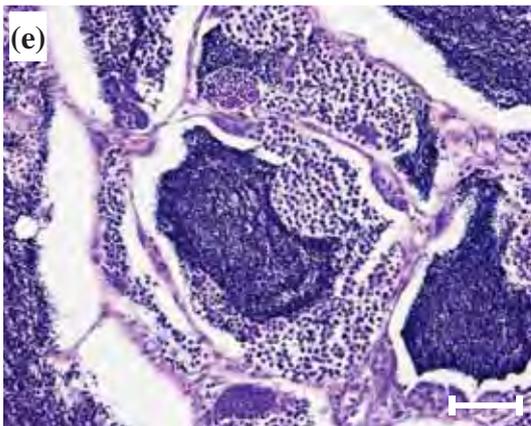
**Jul-Ago/09**



**Set-Out/09**



**Nov-Dez/09**



...Continua

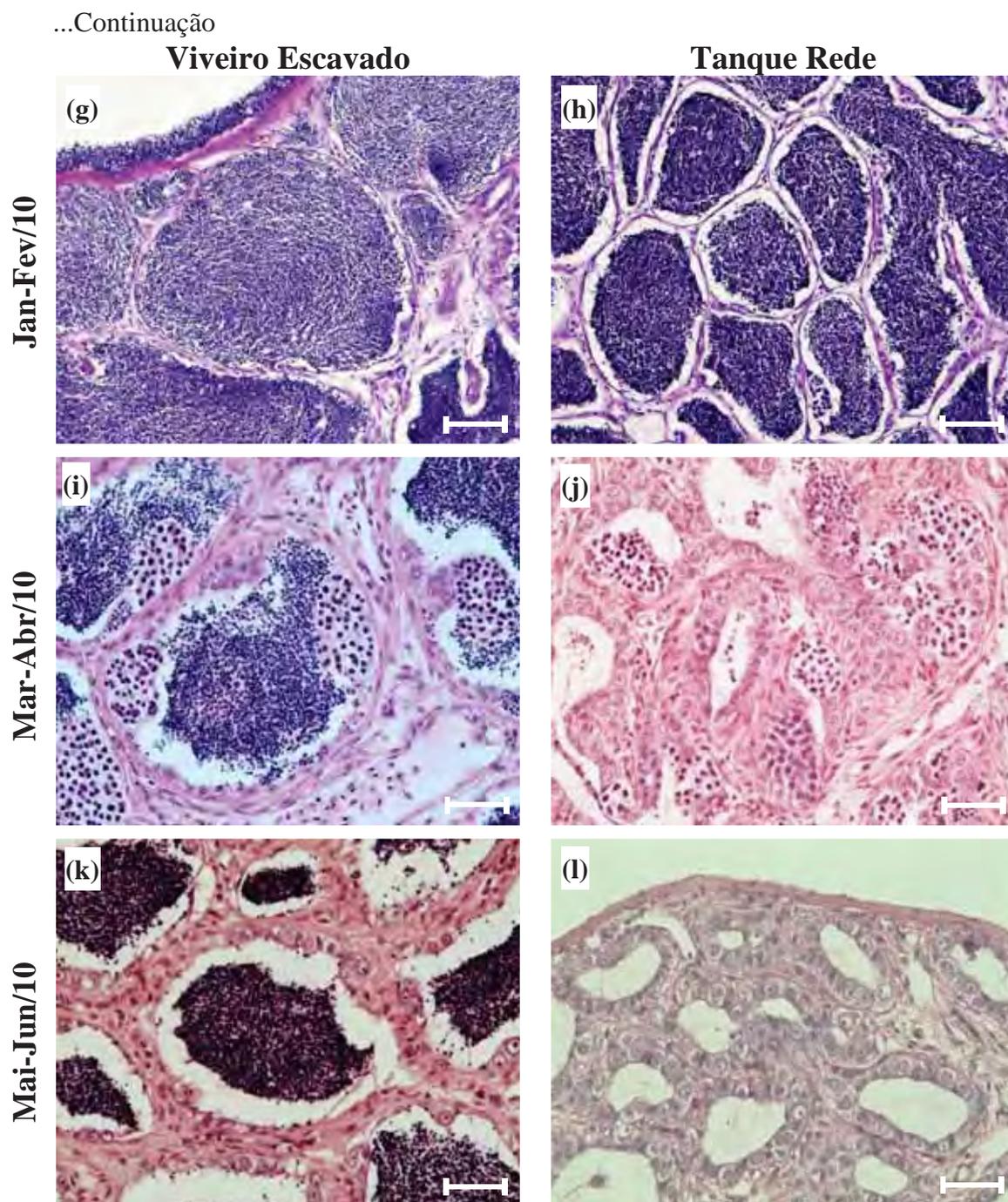


Figura 6. (a-l) Fotomicrografia da característica histológica dos túbulos seminíferos de *P. lineatus*, por meio de cortes transversais de testículos (5 $\mu$ m), em animais mantidos em viveiros escavados (a; c; e; g; i; k) e tanques-rede (b; d; f; h; j; l), ao longo do ano (Barra = 50  $\mu$ m). Hematoxilina-eosina.

Na quarta coleta (Jan-Fev/2010 – início do verão - final da época reprodutiva) ambos os grupos entraram na fase de regressão (Fig. 6g e 6h), apresentando 100% de túbulos revestidos por um EGD (Fig. 5f). Desta vez a fase espermatogonial foi mais intensa que a meiótica, como mostram as frequências de túbulos contendo apenas espermatogônias e túbulos apresentando células meióticas, que, respectivamente, aumentaram (~ 30%) (Fig. 5a) e diminuíram (~ 80%) (Fig. 5c) de forma semelhante nos dois grupos. As médias de IGS e diâmetro de túbulos seminíferos foram maiores em machos mantidos em VEs do que em TRs ( $p < 0,05$ ), porém os valores de IGS diminuíram acentuadamente no primeiro e mantiveram-se estável no segundo, comparando com a coleta anterior (Figs. 4 e 7).

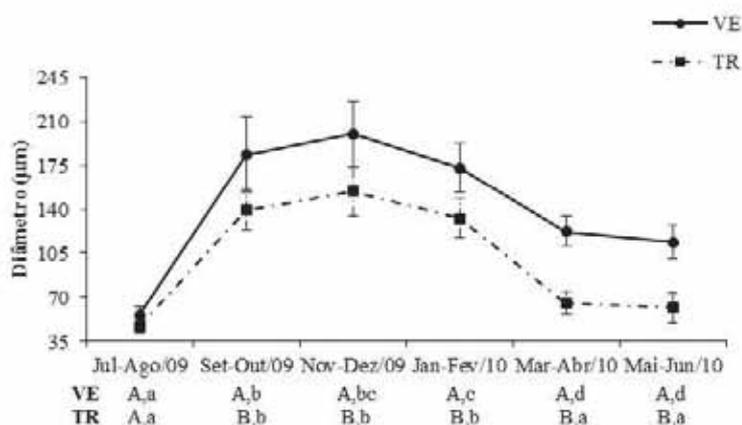


Figura 7. Diâmetro de túbulos seminíferos de testículo de curimatá (*P. lineatus*) mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR) ao longo do ano. Letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ ), enquanto as minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os bimestres ( $p < 0,05$ ).

Na quinta coleta (Mar-Abr/10 - Outono) o processo de regressão foi mais avançado nos machos mantidos em TRs do que nos mantidos em VEs. Os valores de IGS foram maiores nos animais em VEs (~ 0,3) do que nos em TRs (0,05) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 4). Aproximadamente, 50% e 0,1% dos túbulos seminíferos foram preenchidos apenas por espermatogônias, em animais mantidos em TRs e VEs respectivamente

( $p < 0,05$ ) (Fig. 5a). Em ambos os grupos houve maior frequência de túbulos contendo células germinativas imaturas, como espermatogônias secundárias (Fig. 5b), e menor frequência de túbulos contendo células germinativas maduras, como espermátides e espermatozoides maduros (Fig. 5d-e), porém a frequência de túbulos ainda contendo espermatozoides no lúmen foi ~ 4,5 vezes maior em animais mantidos em VEs (~ 75%), do que em TRs (~18%) (Fig. 5e). A frequência de túbulos com EGD foi maior em machos mantidos em VEs (~ 60%), porque muitos dos túbulos de machos em TRs apresentaram maior frequência de túbulos revestidos apenas por espermatogônias (Figs. 5a e 5f; 6i-j), que foram túbulos de pequeno diâmetro revestidos por um EGC (Figs. 6j e 7).

Na sexta coleta (Mai-Jun/10 - início do inverno), testículos de animais em VEs ainda estavam em fase de regressão, enquanto os de animais em TRs já estavam completamente regredidas. Níveis de IGS eram muito reduzidos em ambos os grupos (Fig. 4). A frequência média de túbulos revestidos apenas por espermatogônias foi ~8 vezes maior em machos mantidos em TRs (~ 80%) do que em VEs (~ 10%) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5a). As frequências de túbulos contendo espermatogônias dentro de cistos e espermatozoides foram maiores nos animais em VEs que nos em TRs ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5b e 5e). Em ambos os grupos praticamente não existia mais fase meiótica (Fig. 5c) e espermiogênica (Fig. 5d). A frequência dos túbulos contendo apenas espermatogônias (Figs. 5a e 6k-l) foi maior nos animais mantidos em TRs que nos mantidos em VEs ( $p < 0,05$ ). Este tipo de túbulo apresentou um diâmetro reduzido (~ 50  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 7), revestidos pelo EGC (Fig. 6l), e foram a grande maioria dos túbulos em machos dos TRs (Fig. 6l), conseqüentemente, a frequência de túbulos com EGD foi maior em animais nos VEs que nos TRs ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5f).

### 3.6 *Esteroides gonadais*

O perfil da concentração plasmática de testosterona diferiu numericamente entre os tratamentos, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas durante todo o período experimental (Fig. 8a). Os níveis plasmáticos de testosterona nos animais mantidos nos VEs começam a reduzir de forma gradativa de Jul-Ago/09 até o período de Mar-Abr/10. No entanto, nos animais mantidos em TRs a concentração média aumenta de forma tênue até Nov-Dez/09, quando atingem valores máximos (Fig. 8a). A partir daí, os valores reduzem de forma similar até o final do período experimental (Fig. 8a).

Os perfis dos níveis plasmáticos de 11-cetotestosterona também foram distintos entre os tratamentos. Em animais mantidos nos VEs, os valores permanecem praticamente estáveis durante todo o período, com uma pequena elevação (significativa no mesmo tratamento) nos meses que antecedem (Set-Out/09), e quando ocorrem, a espermição e desova (Nov-Dez/09). Os valores individuais dos machos dos TRs foram muito distintos, o que pode ser evidenciado pela barra de erro (Fig. 8b). Neste grupo, as médias dos valores bimestrais foram significativamente superiores às dos animais mantidos nos VEs na época reprodutiva (Nov-Dez/09 e Jan-Fev/10). Nos machos mantidos em TRs, a elevação nos níveis de testosterona é precoce, e ocorre um bimestre antes comparados aos animais em VEs, no período entre Jul-Ago/09 e Set/Out/09, apresentando um aumento médio de 3,5 vezes no bimestre seguinte (Nov-Dez/09 - época de desova).

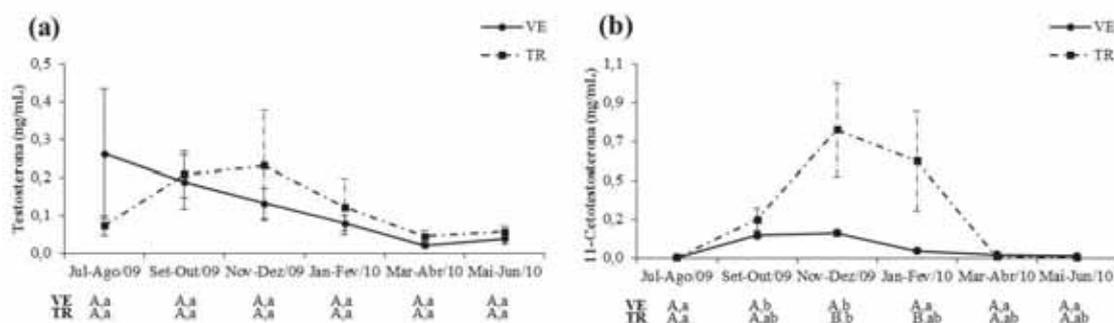


Figura 8. (a-b) Níveis plasmáticos de (a) Testosterona (ng/mL) e (b) 11-Cetotestosterona (ng/mL), em *P. lineatus*, mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR). Letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos na mesma coleta ( $p < 0,05$ ), enquanto as minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os bimestres ( $p < 0,05$ ).

### 3.7 Características seminais

A média do volume de sêmen liberado pelos machos mantidos em VEs foi ~2 vezes maior do que nos animais em TRs (Tabela 1). A motilidade e a taxa de sobrevivência foram similares entre os tratamentos (Tabela 1), no entanto, a concentração espermática foi maior nos machos dos VEs ( $6,76 \times 10^{10} \pm 0,99 \times 10^{10}/\text{mL}$ ) comparados aos machos dos TRs ( $3,93 \times 10^{10} \pm 0,55 \times 10^{10}/\text{mL}$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de sêmen de curimatá, *Prochilodus lineatus*, mantidos em viveiros escavados e tanques-rede.

Médias	Volume (mL)	Motilidade (s)	Sobrevivência (%)	Concentração (Spz/mL)
Viveiros escavados (n=18)	$1,5 \pm 0,3^A$	$44,2 \pm 4,4^A$	$98,9 \pm 0,5^A$	$6,76 \times 10^{10} \pm 0,99 \times 10^{10}^A$
Tanques-rede (n=19)	$0,8 \pm 0,1^B$	$36,3 \pm 2,2^A$	$98,9 \pm 0,6^A$	$3,93 \times 10^{10} \pm 0,55 \times 10^{10}^B$

Letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

### 3.8 Ensaio cometa

Os dados (Fig. 9a) mostram que, nos animais mantidos em VEs, a porcentagem de células com grau de danos na classe 0 (~10%), 1 (~45%) e 2 (~27%) (Fig. 10) foram significativamente maiores comparadas aos animais mantidos em TRs (~0%; 9% e 8%). Conseqüentemente, os animais mantidos em TRs tiveram um nível de dano superior, já

que cerca de 30% dos cometas analisados estavam na classe 3 e 50% na classe 4, contra, 17% e 2%, dos animais mantidos em VEs, respectivamente (Fig. 9a e 10).

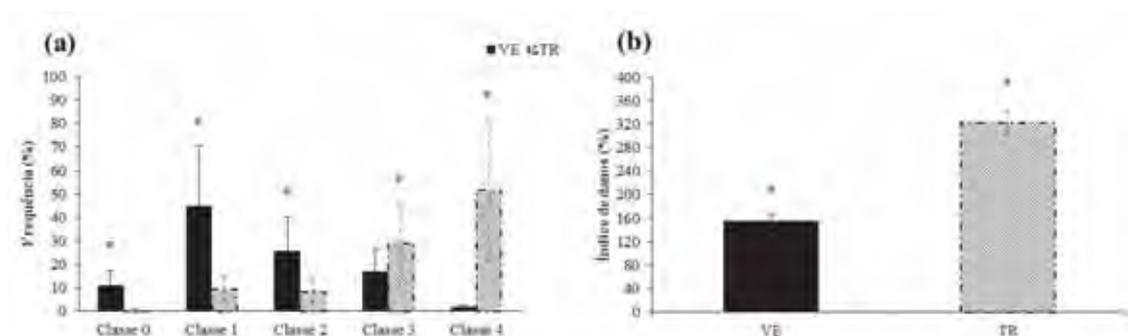


Figura 9. (a-b) Análise de danos de DNA do sêmen de reprodutores de *P. lineatus* mantidos em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR). (a) Frequência por classe de danos (%) e (b) Índice de danos (%). Asteriscos indicam as diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados (Fig. 9b) com índices de danos variando de 0 a 400, representando todos os espermatozoides sem danos ou todos danificados, respectivamente, mostra que animais mantidos em VEs tiveram índices de danos significativamente menores (~160%) comparados aos animais em TRs (~320%), representando, o dobro de danos nos espermatozoides dos animais mantidos em TRs. No entanto, dos danos representados pelos animais dos VEs, ~70% eram danos de classe 1-2, e ~80% dos danos representados nos animais dos TRs eram de classe 3-4 (Figs. 9a e 10).

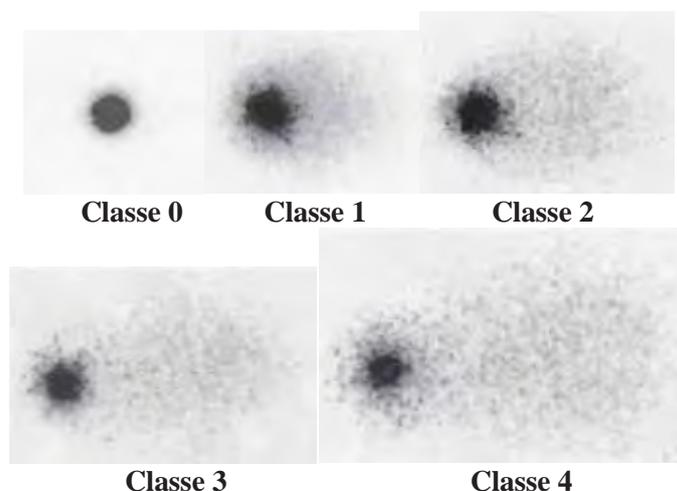


Figura 10. Classes de danos (0-4) de DNA de acordo com a intensidade de fragmentação na cauda do cometa.

### 3.9 Desempenho reprodutivo

Ovócitos fertilizados com sêmen dos peixes mantidos em TRs tiveram taxas de fertilidade e eclosão menores do que quando fertilizados com sêmen dos machos de VEs ( $68,4 \pm 10,1$  e  $82,8 \pm 7,7\%$ ;  $38,4 \pm 5,3\%$  e  $51,0 \pm 7,7\%$ , respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2. Média e erro padrão das taxas de fertilidade de ovos e eclosão de larvas de curimatá, *Prochilodus lineatus*, comparada em viveiros escavados (VE) e tanques-rede (TR).

<i>P. lineatus</i>	Fertilidade (%)	Eclosão (%)
Macho VE X Fêmea VE	$82,8 \pm 07,66^A$	$51,0 \pm 7,71^A$
Macho TR X Fêmea VE	$68,4 \pm 10,14^B$	$38,4 \pm 5,27^B$

Letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Estrutura testicular

A disposição dos testículos dos exemplares de *P. lineatus* utilizados neste experimento foi semelhante às descritas por Alexandrino *et al.* (1985) e Vicentini *et al.* (2001) na mesma espécie. Estes autores referem-se aos testículos como órgãos pares, livres nas porções anterior e média, unidos no terço final e formando um único ducto espermático principal na região superior. Durante o ciclo reprodutivo os testículos dos animais do presente estudo apresentaram algumas variações no tamanho, volume e vascularização, porém não foram observadas mudanças de coloração destes nas mesmas coletas.

Os testículos de curimatá (*P. lineatus*) apresentam um sistema de túbulos ramificados desde a periferia (Vicentini *et al.*, 2001). No entanto, aparentemente a trajetória dos túbulos seminíferos da periferia até o ducto principal é muito tortuosa impedindo a obtenção de cortes longitudinais com todas as extensões dos túbulos seminíferos. De acordo com a organização do compartimento germinativo (Grier e

Uribe-Aranzábal, 2009), o tipo do testículo e o padrão estrutural apresentado pelos animais desse trabalho foi o tubular anastomosado com padrão espermatogonial irrestrito. Segundo Grier *et al.* (1980 e 1981), esse é o padrão encontrado em peixes das famílias Cyprinodontidae, Cryziatidae, Bellonidae e Exocoetidae. Segundo esses autores, este tipo de testículo é típico dos teleósteos, Romagosa *et al.* (1999 e 2000) e Vicentini *et al.* (2001) também encontraram o mesmo padrão em *Brycon cephalus* e *P. scrofa*, respectivamente. Assim como, em outras espécies de peixes, como o *Piaractus mesopotamicus* (Cruz-Landim *et al.*, 2005), a espermatogênese do *P. lineatus* ocorre dentro de cistos, enquanto em outras espécies como as da classe Blennidae, *Neoceratis spinifer* e *Lepadogaster lepadogaster*, a espermatogênese é semi-cística, já que parte do processo ocorre fora de cistos.

#### **4.2 Características gerais**

Os resultados mostraram que machos de *P. lineatus* mantidos nos TRs, produziram espermatozoides de baixa qualidade. Os efeitos do manejo inadequado foram observados durante todo o processo anual de espermatogênese, principalmente, na época de reprodução, quando o valor médio do IGS dos animais mantidos em TRs foi ~2,5 vezes menor do que nos de VEs. Um aumento gradual nos valores de IGS, após o processo de maturação testicular, tem sido amplamente reportado para várias espécies reoflicas, incluindo o *Piaractus mesopotamicus* (Gazola e Borella, 1997) e o *Pseudoplatystoma fasciatum* (Batlouni *et al.*, 2006). Assim, a ausência de um pico de IGS, para *P. lineatus* mantidos em TRs durante a época de espermição e desova, provavelmente está associado em reflexo a um processo espermatogênico insuficiente, com testículos apresentando túbulos seminíferos de diâmetro reduzido e predominantemente revestidos por células espermatogênicas imaturas.

Diversos trabalhos têm mostrado que condições inadequadas podem impactar na produção e a qualidade dos espermatozoides em peixes. Neste contexto, destacam-se os trabalhos que mostram os efeitos da exposição crônica ou a curtos períodos à hipóxia (Wu, 2009). Exposições crônicas a baixos níveis de oxigênio dissolvido podem reduzir o tamanho dos testículos, retardar a espermatogênese e o desenvolvimento testicular, em peixes (Wu, 2009). Carpas (*Cyprinus carpio*) (Wu *et al.*, 2003) e corvinas do Atlântico (*Micropogonias undulatus*) (Thomas *et al.*, 2006 e 2007) submetidas a hipóxia ( $1,0 \pm 0,2\text{mg}$  e  $1,7\text{mg}$  de  $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ , por 8 e 10 semanas, respectivamente) apresentaram, respectivamente, redução de 40% e 50% no IGS, retardo no desenvolvimento testicular e na qualidade dos espermatozoides. Ainda neste contexto, devemos mencionar que não só a hipóxia, mas outros agentes podem reduzir a qualidade dos espermatozoides em peixes. Exemplares machos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) periodicamente retirados da água e expostos ao ar (exposição repetida ao estresse agudo) durante 9 meses, apresentaram redução significativa na qualidade dos espermatozoides (Campbell *et al.*, 1992). No caso do *P. lineatus*, os reflexos do sistema inadequado de manejo foram similares aos descritos previamente, com retardo e encurtamento da estação reprodutiva, redução de mais de 60% no IGS (na época reprodutiva), e na qualidade dos gametas. Desta forma, serão aqui discutidos de forma pioneira os mecanismos pelos quais o manejo inapropriado impacta a espermatogênese e a qualidade do sêmen em peixes reofílicos sul-americanos.

### **4.3 Sistemas de produção**

Com relação ao uso de TRs, a literatura é extremamente escassa para peixes migradores nativos, e um único trabalho mostrou recentemente que machos de *Rhamdia quelen* (peixe reofílico da América do Sul), mantidos em TRs, podem apresentar ciclo reprodutivo normal e produzir espermatozoides (Reidel *et al.*, 2010). No estudo com *R.*

*quelen*, a densidade de estocagem foi maior do que a deste ( $6,8 \text{ kg.m}^{-3}$ ), variando de  $\sim 15\text{-}25 \text{ kg.m}^{-3}$ ; os TRs foram maiores ( $300 \text{ m}^3$ ) que os de *P. lineatus* ( $6 \text{ m}^3$ ); e o número de *P. lineatus* (100/ TR) foi menor que o de *R. quelen* (350/TR). Finalmente, em relação aos níveis de oxigênio dissolvido, os valores aqui obtidos foram  $3,77 \pm 0,46$  e  $2,04 \pm 0,35 \text{ mg.L}^{-1}$ , em animais mantidos em VEs e TRs, respectivamente; enquanto que o nível para o estudo com *R. quelen* foi  $7,40 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ . Analisados de maneira abrangente, estes dados sugerem que é possível criar reprodutores, reofílicos, em TRs, desde que consideremos as características individuais de cada espécie e tendo especial cuidado para fornecer água de boa qualidade.

Neste contexto, o objetivo deste estudo não foi avaliar os efeitos de variáveis isoladas, tais como densidade de estocagem, volume do tanque ou o número de indivíduos por tanque, sobre o desempenho reprodutivo de *P. lineatus*, mas avaliar o efeito global do manejo inadequado e seus respectivos mecanismos de dano sobre a espermatogênese e o desempenho reprodutivo da espécie. Além disso, as diferenças relacionadas com o comportamento natural de cada espécie devem ser consideradas. *R. quelen* (Reidel *et al.*, 2010) é um bagre onívoro com tendência carnívora, enquanto que *P. lineatus* é um peixe iliófago que se alimenta principalmente no fundo de lagoas/rios (Rios *et al.*, 2011). Neste caso, é possível que os exemplares de *P. lineatus* sofreram um maior impacto nutricional que os exemplares de *R. quelen*, já que os TRs limitam o acesso dos peixes ao fundo do viveiro. Sendo assim, a comparação dos dados não é adequada e se torna ainda mais difícil quando as condições experimentais (ambiente, densidade, qualidade da água e clima) variam entre os estudos. Assim, para definir os efeitos dos sistemas de criação (tanques-rede ou viveiros escavados) sobre a espermatogênese e o desempenho reprodutivo de qualquer espécie reofílica, é relevante considerar tantas variáveis quanto possíveis relacionadas com cada espécie de peixe.

#### 4.4 *Histomorfometria dos testículos*

Mudanças histológicas nos testículos durante o ciclo reprodutivo foram diferentes nos animais dos dois sistemas estudados. Nos meses de julho e agosto/09, ~70% e ~15% dos túbulos seminíferos analisados, dos animais de TRs e VEs, eram revestidos apenas por espermatogônias. Em contrapartida, no mesmo período, nos animais mantidos em VEs foi encontrado um percentual quase 6 vezes maior de túbulos que já apresentavam cistos de espermátides. Estes resultados indicam que o manejo inadequado afetou a espermatogênese ainda nos meses de inverno, com reflexos diretos sobre a performance reprodutiva dos peixes (redução da concentração e volume espermático seis meses depois, durante a época de reprodução (Nov/09-Fev/10).

Neste contexto, é sabido que a disponibilidade reduzida de alimento, por si só, pode causar supressão da gametogênese e redução da fertilidade em peixes (Campbell *et al.*, 1992). O problema maior é distinguir entre as consequências diretas de agentes estressores na reprodução e as consequências indiretas devido a fatores nutricionais (Tyler *et al.*, 1990). Em juvenis de *Brycon insignis* (uma espécie de peixe reofílico nativo), elevadas densidade de estocagem (6 peixes.m<sup>-3</sup>) reduziram a massa corporal, o comprimento final, o ganho de peso e a eficiência na conversão alimentar em comparação com o grupo mantido em densidade reduzida (3 peixes.m<sup>-3</sup>) (Tolussi *et al.*, 2010). No entanto, não se pode excluir o efeito direto de agentes estressores diretamente na reprodução, uma vez que Campbell *et al.* (1992), demonstraram que peixes submetidos ao estresse crônico não apresentaram diferenças nem de peso nem de comprimento, mas sim uma redução significativa na concentração espermática e redução nas taxas de sobrevivência de larvas produzidas com estes gametas.

No nosso estudo não foi possível estabelecer se o impacto sobre a espermatogênese foi efeito direto das condições de manejo aplicadas, ou se foram

consequências indiretas do desenvolvimento, evidenciadas pelas reduções dos valores médios de K e massa corporal nos machos mantidos em TRs. No entanto, fica claro que as condições propiciadas nos TRs, como alta densidade de estocagem e água de baixa qualidade, são muito próximas àsquelas encontradas em viveiros de muitas pisciculturas. Estes fatores, aliados a falta de manutenção de viveiros, não retirada de matéria orgânica e baixa renovação de água, criam um sistema complexo de variáveis negativas sobre o crescimento e desempenho reprodutivo de reprodutores. Diversos trabalhos abordaram variáveis isoladas sobre o desempenho reprodutivo dos peixes, tais como: volume de tanque insuficiente (Buchet *et al.*, 2008), fotoperíodo inadequado (Fontaine *et al.*, 2006), alimento de má qualidade (Reidel *et al.*, 2010), exposição a fertilizantes (Ram e Sathyanesan, 1986) e particularmente hipóxia (Wu *et al.*, 2003; Shang *et al.*, 2006; Landry *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2007; Wu, 2009). No entanto, em viveiros de piscicultura estas variáveis estão presentes todas ao mesmo tempo. Não obstante, devemos considerar também que as variações ambientais extremas que ocorrem em regiões tropicais ao longo dos dias, meses e anos, não podem ser simuladas, considerando apenas variáveis isoladas.

Desta forma, nos próximos parágrafos vamos nos ater a discutir os possíveis mecanismos pelos quais a espermatogênese foi impactada, e não sobre o efeito de variáveis específicas em separado, uma vez que não foi a proposta deste estudo.

#### **4.5 Espermatogênese**

De acordo com Grier (2002) o testículo de peixes apresentam duas funções básicas: produzir e estocar espermatozoides. À medida que o ciclo reprodutivo avança a função principal dos testículos, que era de produzir espermatozoides, passa a ser o estoque de espermatozoides. Nesta mudança, o epitélio germinativo contínuo (com função de produção de espermatozoides) passa a ser substituído por um epitélio

germinativo descontínuo (com função de estoque de sêmen). Os dois tipos de epitélio ocorrem simultaneamente na gônada, no entanto o EGC é predominantemente encontrado em testículos em maturação inicial e se caracteriza quando os túbulos apresentam toda sua extensão revestida por células germinativas. Por outro lado, o EGD ocorre predominantemente em testículos em maturação final e em regressão, onde os túbulos apresentam áreas sem revestimento de células germinativas (Grier, 2002). Neste contexto, uma frequência significativamente maior de túbulos com EGD, nos animais dos VEs, em novembro (época reprodutiva), indica uma clara transição na função testicular de produzir para estocar espermatozoides. Nos machos mantidos em VEs esta transição coincide com pico de IGS e época de desova, quando os testículos já estão repletos de espermatozoides. Por outro lado, nos animais de TRs a frequência de túbulos revestidos com EGD é 8 vezes menor do que em VEs, na época reprodutiva não há um pico de IGS, e os testículos apresentam uma frequência significativamente maior de túbulos com proliferação de espermatogônias e atividade meiótica, em plena estação de desova.

Ainda neste contexto, devemos mencionar não só o atraso na espermatogênese, mas também o encurtamento na época de espermição dos machos de TRs. Ao final da época de desova (Mar-Jun/10), a presença de túbulos com EGC predominantemente revestidos apenas por espermatogônias e desprovidos de espermatozoides é muito mais acentuada e surge de forma mais abrupta nos animais de TRs. Por outro lado, foi constatada uma frequência 8 vezes maior de túbulos que ainda apresentavam espermatozoides nos testículos dos machos mantidos em VEs do que em TRs.

Nossos resultados revelaram, também, outra forma de impacto na espermatogênese nos peixes de TRs, que foi a redução no diâmetro dos túbulos seminíferos. O diâmetro dos túbulos está ligado diretamente a uma frequência maior de

proliferação de células de Sertoli (Schulz *et al.*, 2005, Nóbrega *et al.*, 2009). Em peixes, diferentemente dos mamíferos, as células de Sertoli continuam proliferando por toda a vida do animal, sem cessar na puberdade, sendo o principal mecanismo responsável pelo crescimento do testículo de peixes ao longo do ano, por meio do aumento do diâmetro e comprimento dos túbulos (Schulz *et al.*, 2005). Desta forma, muito provavelmente nos machos de TRs as células de Sertoli não proliferaram de forma apropriada, o que pode estar ligado à redução significativa no diâmetro dos túbulos seminíferos a partir de Set-Out/09, que perdurou por todo período experimental. Desta forma, seria interessante em futuras abordagens avaliar este aspecto em reprodutores submetidos ao estresse crônico, uma vez demonstrado recentemente, que a exposição de tilápias a temperaturas baixas ou elevadas, também pode alterar a taxa de proliferação das células de Sertoli (Alvarenga e França, 2009).

Além disso, cada célula de Sertoli em peixes pode dar suporte a cerca de 100 espermatídes, muito mais do que qualquer espécie de mamífero já descrita (Matta *et al.*, 2002; Vilela *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005). Desta forma, obviamente quão maior for o número de células de Sertoli, maior será a concentração final de espermatozoides (Schulz *et al.*, 2010). Neste estudo, as concentrações espermáticas foram significativamente menores nos machos de TRs, corroborando a ideia de que as células de Sertoli destes peixes tiveram uma taxa de proliferação reduzida, contribuindo para a uma menor concentração espermática neste grupo.

#### **4.6 Esteroides gonadais**

As concentrações plasmáticas de testosterona, de *P. lineatus*, foram similares entre os tratamentos e não se associam com as diferenças encontradas ao longo do ciclo reprodutivo entre os grupos. Além disso, em ambos os tratamentos, os valores foram muito heterogêneos, dentro dos grupos, durante as fases de maturação e desova (Jul/09-

Fev/10), impossibilitando o estabelecimento de alguma conclusão coletiva. Os valores de testosterona, dos machos mantidos em VEs e TRs, apresentaram perfil similar aos descritos para o pacu, outra espécie reofílica sul-americana, com valores maiores no período de maturação e redução após a época reprodutiva. No entanto, os valores médios mais altos descritos para o pacu (2300 pg/ml) foram aproximadamente 10 vezes superiores aos valores mais elevados obtidos com o *P. lineatus* (~250 pg/ml), podendo ser esta uma característica de cada espécie.

Com relação à 11-KT, os valores foram homogêneos durante todo período experimental nos animais dos VEs, que apresentaram um pico na estação de desova, com perfil similar aos obtidos com pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Gazola e Borella *et al.*, 1997). Em ambos os tratamentos (VE e TR) houve uma elevação de 11-KT na época de maturação e redução após a época de desova. No entanto, assim como para a testosterona, no pacu os valores mais altos de 11-KT foram mais elevados (2300 pg/ml) que no *P. lineatus* (700 e 100 pg/ml respectivamente para TR e VE). As principais diferenças entre os machos de VEs e TRs foram encontradas na estação de desova (Nov/09-Fev/10) onde os valores foram ~7 vezes maiores nos machos de TRs. Além disso, nos machos de TR os níveis desta substância começaram a se elevar em Set-Out/09, dois meses antes que em VE. A 11-cetotestosterona é o hormônio mais potente na indução da espermatogênese em peixes (Nagahama e Yamashita, 2008), e relaciona-se principalmente com as fases espermiogênicas (Nóbrega *et al.*, 2009). No entanto, não foi encontrada uma relação direta entre os maiores níveis médios desta substância em TR, com qualquer parâmetro de desenvolvimento testicular analisado. Além disso, os níveis de 11-cetotestosterona foram muito distintos entre os indivíduos de TR, podendo ser uma resposta ao estabelecimento de dominância entre os mesmos, ou refletir uma condição seguramente de maior estresse nos TRs, já que existe uma correlação positiva

entre 11-KT e cortisol (Milla *et al.*, 2009, Gupta e Kalbach, 2011). No entanto, torna-se difícil a interpretação destes dados devido a enorme variação de valores entre animais do mesmo grupo. Desta forma, os níveis de testosterona e 11-KT não explicam as diferenças encontradas entre os grupos.

#### **4.7 Parâmetros espermáticos**

Com relação aos parâmetros espermáticos analisados, as principais diferenças entre os grupos foram o volume e a concentração de espermatozoides, que foram respectivamente 2 e ~ 1,7 vezes maior para os machos de VE em relação aos de TR. Como dito anteriormente, as células de Sertoli estão diretamente associadas com estas duas funções, tanto por participar da produção do líquido seminal quanto por dar suporte para a formação de espermatozoides (Schulz *et al.*, 2010). Desta forma, futuras abordagens poderiam investigar os mecanismos pelos quais estas células são alteradas em condições inadequadas de manejo. Ainda neste contexto, os resultados obtidos com a técnica do cometa trazem uma importante reflexão sobre os métodos de análise do sêmen. Neste estudo, a taxa de sobrevivência e motilidade espermática foram similares entre os grupos, e são parâmetros amplamente utilizados para se falar sobre a qualidade dos gametas masculinos (Lubzens *et al.*, 2010). No entanto, o nível de fragmentação do DNA dos espermatozoides medidos pela extensão das caudas dos cometas (Green *et al.*, 1996) indica uma quantidade significativamente maior de danos nos animais de TRs, justificando uma redução significativa, nas taxas de fertilidade e eclosão, obtidas com o uso de sêmen de machos deste grupo em relação às obtidas com uso de sêmen de machos de VEs. De acordo com Lubzens *et al.* (2010), a principal forma de se avaliar a qualidade dos gametas, é checar a sua capacidade de fecundar gametas do sexo oposto. Desta forma, concluímos que as condições propiciadas nos TRs não só reduziram a

quantidade de sêmen e gametas produzidos nos animais de TRs, como também a qualidade dos mesmos.

## 5 CONCLUSÃO

De forma similar a outros peixes submetidos a condições adversas (revisão em Wu, 2009), os peixes em TR tiveram sua espermatogênese prejudicada, mas não interrompida. Estes fatos ficam claros ao avaliar a dinâmica do processo de aumento e redução de IGS entre os tratamentos ao longo do ano, que apresentou perfil similar. No entanto, mesmo com todas estas características adversas, os machos em TRs foram capazes de produzir quantidades razoáveis de espermatozoides. Este fato traz uma importante reflexão e preocupação com medidas tomadas empiricamente por produtores, que não selecionam os doadores de sêmen para fecundar a desova e frequentemente usam qualquer macho disponível, que libere alguma quantidade de sêmen em exames de palpação. Neste caso, nossos resultados mostraram definitivamente que reprodutores de *P. lineatus* mantidos em condições inadequadas produzem gametas de baixa qualidade. Além disso, os resultados obtidos ao longo do ano, em análises periódicas, mostram que mesmo no inverno, muito tempo antes da desova (seis meses), os machos de *P. lineatus* já são susceptíveis ao manejo inapropriado.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRINO, A.C.; PHAN, N.T.; PINHEIRO, E.F.G. (1985). Caracterização macroscópica das gônadas de curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. *Boletim de Zoologia*. 9: 159-175.
- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; FENERICH-VERANI, N. (2001). Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (steindachner, 1876), após estimulação hormonal. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27(2): 149-154.

- BATLOUNI, S.R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M.I. (2006). The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium an approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science*. 96: 116-132.
- BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; et al. (2006). Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35(4): 1251-1257.
- BROOKS, S.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J. (1997). Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in fish and fisheries*. 7: 387-416.
- BROWN-PETERSON, N.J.; GRIER, H.J.; OVERSTREET, R.M. (2002). Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *Journal of Fish Biology*. 60: 178-202.
- BUCHET, V.; COQUARD, E.; SÉVÈRE, A.; BARONE, H. (2008). Influence of tank volume on vitellogenesis and spawning performances in sea bass *Dicentrarchus labrax* L., *Aquaculture Research*. 39: 420-426.
- CABRITA, E.; ROBLES, V.; REBORDINOS, L.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M.P. (2005). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*. 50: 144-153.
- CAMPBELL, P.M.; POTTINGER, T.G.; SUMPTER, J.P. (1992). Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biology of Reproduction*. 47, 1140-1150.
- CECCARELLI, P.S.; SENHORINI, J.A.; VOLPATO, G. Dicas em piscicultura - perguntas e respostas. Botucatu: Ed. Santana, 247p, 2000.
- CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F.C.; CRUZ-HÖFLINQ, M.A. (2005). Morphological changes of Sertoli cells during the male reproductive cycle of the teleost *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Brazilian Journal of Biology*. 65 (2): 241-9.
- DABROWSKI, K.; RINCHARD, J.; OTTOBRE, J.S.; ALCANTARA, F.; PADILLA, P.; CIERESZKO, A.; DE JESUS, M.J.; KOHLER, C.C. (2003). Effect of Oxygen Saturation

- in Water on Reproductive Performances of Pacu *Piaractus brachypomus*. *World Aquaculture Society*. 34(4): 441-449.
- DE ALVARENGA, E.R.; DE FRANÇA, L.R. (2009). Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Biology of Reproduction*. 80(3): 537-44.
- DE FELICE, D.A.; RASCH, E.M. (1969). Chronology of spermatogenesis and spermiogenesis in Poeciliid fishes. *Journal of Experimental Zoology*. 171: 191-208.
- FERREIRA, A.A.; NUÑER, A.P.O.; LUZ, R.K.; TATAJE, D.A.R.; ESQUIVEL, J.R.; RESTREPO, J.B. (2001). Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do Jundiá, *Rhamdia quelen*. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 27 (1): 57-60.
- FONTAINE, P.; PEREIRA, C.; WANG, N.; MARIE, M. (2006). Influence of pre-inductive photoperiod variations on Eurasian perch *Perca fluviatilis* broodstock response to an inductive photothermal program. *Aquaculture*. 255: 410-416.
- GAZOLA, R.A.; BORELLA, M.I. (1997). Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels in male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Cypriniformes). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30 (12): 1485-1487.
- GREEN, M.H.L.; LOWE, J.E.; DELANEY, C.A.; GREEN, I.C. (1996). Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells, *Methods Enzymol*. 269: 243-266.
- GRIER, H.J.; LINTON, J.R.; LEATHERLAND, J.F.; DE VLAMING, V.L. (1980). Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *American Journal Anatomy*. 159: 331-345.
- GRIER, H.J.; BURNS, J.R.; FLORES, J.A. (1981). Testis structure in the three species of teleost with tubular gonopodia. *Copeia*, 4: 797-801.
- GRIER, H.J.; TAYLOR, R.G. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*. 53: 521-542.
- GRIER, H.J. (2002). The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. *In:*

- Creswell, R.L. (Ed.). Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, November 2000. Fort Pierce, Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium, 537-552.
- GUPTA S.; KALBACH, B.G. (2011). The relationship between 11-ketotestosterone, cortisol, and testosterone and condition index for *Poecilia reticulata*. *Biological Sciences*. URL: <http://digitalcommons.calpoly.edu/biosp/12>, acessado em Setembro de 2011.
- LANDRY, C.A.; STEELE, S.L.; MANNING, S.; CHEEK, A.O. (2007). Long term hypoxia suppress reproductive capacity in the estuarine fish, *Fundulus grandis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 148: 317-323.
- 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. *Biology of Reproduction*. Jul; 81(1): 177-87.
- LE CREN, E.D. (1951). The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*. 20: 201-19.
- LUBZENS, E.; CERDÀ, J.; YOUNG, G.; BOBE, J. (2010). Oogenesis in teleost fish: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 367-389.
- LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALT, D.T.; ZANIBONI FILHO, E. (2001). Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (PIMELODIDAE). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27 (1): 39-42.
- MATTA, S.L.; VILELA, D.A.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. (2002). The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology* 143: 970-978.
- MOREIRA, R.G. (1999). Esteroides gonadais, proteína, lipídios plasmáticos e hepáticos em relação ao ciclo reprodutivo do dourado *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1840) (Pisces Characiformes: Characidae) de ambiente natural. *Tese de Doutorado*. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 108p.

- NAGAHAMA, Y.E.; YAMASHITA, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish, *Development, Growth & Differentiation*. 50: S195-S219.
- 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 Physiology and Biochemistry*. 35: 197-206.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. (1984). Microelectrophoretic study on radiation-induced DNA migration from individual cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123: 291-298.
- REIDEL, A.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A.; ROMAGOSA, E. (2010). The effect of diets with different levels of protein and energy on the process of final maturation of the gametes of *Rhamdia quelen* stocked in cages. *Aquaculture*. 298; 354-359.
- RIOS, F.S.A.; CARVALHO, C.S.; PINHEIRO, G.H.D.; DONATTI, L.; FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. (2011). Utilization of endogenous reserves and effects of starvation on the health of *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). *Environmental Biology of Fishes*. 91; 87-94.
- ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y.; BORELLA, M.I.; PARIERA, S.F.; FENERICH-VERANI, N. (1999). Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). *Tissue & Cell*. 31 (6): 540-544.
- ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y.; AYROZA, L.M.S.; BORELLA, M.I.; FENERICH-VERANI, N. (2000). Reproductive cycle of male matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. 17: 101-105.
- SCHULZ, R.W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, 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. *Biology of reproduction*. 73: 891-898.
- SCHULZ, R.W.; FRANÇA, L.R.; LAREYRE, J.J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NÓBREGA, R.H.; MIURA, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165: 390-411.

- SHANG, E.; WYU, R.; WU, R. (2006). Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Science & Technology*. 40, 3118-3122.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JUNIOR, M.V.; GODINHO, H.P.; YASUI, G.S. (2007). Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces-characidae). *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*. 59(4): 887-882.
- THOMAS, P.; RAHMAN, M.S.; KUMMER, J.A.; LAWSON, S. (2006). Reproductive endocrine dysfunction in Atlantic croaker exposed to hypoxia. *Marine Environmental Research*. 62: S249-S252.
- THOMAS, P.; RAHMAN, M.S.; KHAN I, A.; KUMMER, J.A. (2007). Widespread endocrine disruption and reproductive impairment in an estuarine fish population exposed to seasonal hypoxia, *Proceedings of the Royal Society of London [B]*. 274: 2693-2701.
- TOLUSSI, C.E.; HILSDORF, A.W.S.; CANEPPELE, D.; MOREIRA, R.G. (2010). The effects of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1877). *Aquaculture* (Amsterdam). 310: 221-228.
- TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P.; WITTHAMES, P.R. (1990). The dynamics of oocyte growth during vitellogenesis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*. 43, 202-209.
- VICENTINI, C.A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I.B.; BENETTI, E.J.; ORSI, A.M. (2001). Testicular ultrastructure and morphology of the seminal pathway in *Prochilodus scrofa*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. 33: 357-362.
- VILELA, D.A.R.; SILVA, S.G.B.; PEIXOTO, M.T.D.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. (2003). Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: 187-190.

- WU, R.S.S.; ZHOU, B.S.; RANDALL, D.J.; WOO, N.Y.; LAM, P.K. (2003). Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction. *Environmental Science and Technology*. 37: 1137-1141.
- WU, R.S.S. (2009). Effects of hypoxia on fish reproduction and development. *In*: Richards, J.G.; Farrell, A.P.; Brauner, C.J. (Eds.). *Fish Physiology*. Academic Press. 27: 79-141.
- ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. (2007). Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte. 31: 367-373.