

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITO DA PROPORÇÃO SEXUAL E DA
DENSIDADE DE ESTOCAGEM SOBRE O
DESEMPENHO REPRODUTIVO DO LAMBARI
Astyanax altiparanae (Characiformes: Characidae)
EM SISTEMA SEMI-NATURAL**

Adalberto da Silva Junior

Médico Veterinário

Jaboticabal-SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITO DA PROPORÇÃO SEXUAL E DA
DENSIDADE DE ESTOCAGEM SOBRE O
DESEMPENHO REPRODUTIVO DO LAMBARI**
Astyanax altiparanae (Characiformes: Characidae)
EM SISTEMA SEMI-NATURAL

Adalberto da Silva Junior

Orientador: Dr. Sergio Ricardo Batlouni

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

Jaboticabal-SP

2019

Silva Junior, Adalberto da
S586e Efeito da proporção sexual e da densidade de estocagem sobre o desempenho reprodutivo do lambari *Astyanax altiparanae* (Characiformes: characidae) em sistema semi-natural / Adalberto da Silva Junior. -- Jaboticabal, 2019
vii, 48 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2019

Orientador: Sergio Ricardo Batlouni

Banca examinadora: Laura Satiko Okada Nakaghi, Regiane Cristina da Silva

Bibliografia

1. Reprodução induzida. 2. Desempenho reprodutivo. 3. *Astyanax altiparanae*. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito da proporção sexual e da densidade de estocagem sobre o desempenho reprodutivo do lambari *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) em sistema semi-natural

AUTOR: ADALBERTO DA SILVA JUNIOR

ORIENTADOR: 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 / Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP

Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Dra. REGIANE CRISTINA DA SILVA

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP

Jaboticabal, 28 de junho de 2019

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
APOIO FINANCEIRO	iii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	iv
SUMÁRIO DE FIGURAS.....	v
SUMÁRIO DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Delineamento experimental e análises	16
2.2. Experimento 1: Efeito da densidade de estocagem.....	17
2.3. Desempenho reprodutivo.....	18
2.4. Análise descritiva e da densidade de volume (frequência percentual) dos diferentes estágios de maturação dos oócitos.....	19
2.5. Hormônios esteroides.....	21
2.6. Experimento 2: Efeito da proporção sexual	22
2.7. Análise estatística	22
2.8. Aprovação do uso de animais em pesquisa:	23
3. RESULTADOS.....	23
4. DISCUSSÃO	34
5. REFERÊNCIAS.....	40

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que está conosco todos os dias nos iluminando, trazendo paz e tantas graças para os nossos dias e por ter me dado força para seguir nos momentos de provação. A Oxum, rainha das águas doces que esteve comigo na reta final e me deu força e equilíbrio.

Aos meus pais Adalberto da Silva e Maria Aparecida Galvani Silva que me proporcionaram esta oportunidade de continuar meus estudos, sempre me deram força e garra para chegar a esta vitória, com muito amor, carinho e confiança.

Ao meu orientador Dr. Sergio Ricardo Batlouni meu sincero muito obrigado, por ter aceitado me orientar, pelos conselhos, paciência, apoio, incentivo e oportunidades durante todo este período.

Aos meus companheiros de laboratório, Rafael (Chupeta) a Mariana, Laiza e Daniel (Xina) pela amizade e auxílio na execução deste trabalho.

Aos meus irmãos da República Tapa Xana Olavo (Catequese), Caio (Rolinha), Rafael (Pokas), Felipe (Bafo), Vitor (Corsim), Vitor (Curuja), Carlos (Coisera), Rodrigo (Maiszum), Israel (Exótico), Luiz Paulo (Nomade) e Matheus (Ciro) e a minha segunda mãe Joseane por ser minha família por todo este tempo, por todo aprendizado e pela experiência que tive na companhia de vocês.

Ao CAUNESP que forneceu toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

A Pós-Graduação do CAUNESP pela oportunidade de ingressar no mestrado.

Aos funcionários do CAUNESP Valdecir, Marcio (Perereca) e Luiz.

APOIO FINANCEIRO

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico **CNPq** pela bolsa de mestrado (cota do Programa de Pós-Graduação do **CAUNESP**) concedida.

LISTA DE ABREVIações

EHC - Extrato de hipófise de carpa

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

GtHs- Gonadotrofinas

FSH - Hormônio Foliculo-estimulante

LH - Hormônio Luteinizante

E2 - 17 β -estradiol ou Estradiol

DA – Dopamina

T - Testosterona

17 α ,20 β -DHP - 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one

PV- Oócito pré-vitelogênico

AC - Oócito alvéolo cortical

VI - Oócito vitelogênico incompleto

VC - Oócito vitelogênico completo

GVBD - Oócito após a quebra da vesícula germinativa

FPO - Folículo pós ovulatório

AT - Oócito atrésico

TI - Tecido intersticial

IGS - Índice gonadossomático

M - Machos

F – Fêmeas

UTA – Unidades térmicas acumuladas

HF – Hematoxilina/Floxina

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos oócitos encontrados em diferentes estágios da maturação em *A. altiparanae*. A: oócito pré-vitelogênico (PV), B: oócito alvéolo cortical (AC), C: oócito vitelogênico incompleto (VI)(seta), D: oócito vitelogênico completo (VC), E: folículo pós-ovulatório (FPO)(seta), F: oócito com quebra da vesícula germinativa (GVBD)(seta), G: oócito atrésico (AT), H: tecido intersticial (TI). Abreviações: núcleo (N). Coloração: Hematoxilina/Floxina.

Figura 2. Exemplo do grid de 352 pontos aplicado sobre as fotomicrografias dos cortes histológicos para análise frequencial percentual dos diferentes estágios de maturação dos oócitos. Coloração: Hematoxilina/floxina.

Figura 3. Regressão linear entre o volume médio de desova considerando todas as réplicas pelo número de animais por unidade experimental G1: (4); G2: (8); G3: (16); G4: (24) indivíduos. Cada ponto representa o volume de desova de cada réplica.

Figura 4. Relação entre o volume médio de desova considerando todas as réplicas e o número de machos (A) e número de fêmeas (B) nas unidades experimentais em *Astyanax altiparanae*. G1: 6M:6F; G2: 8M 4F; G3: 9M:3F; G4: 4M:8F; G5: 3M:9F; G6 12F; G7: 12F. Cada ponto representa o volume de desova de cada réplica. Regreções lineares e cúbicas foram utilizadas; * P <0,05.

Figura 5. Níveis plasmáticos de E2 (ng /mL) (A) e DHP (ng /mL) (B), em *A. altiparanae* com diferentes densidades de estocagem: G1 (2M e1F), G2 6 (4M e 2F), G3 12 (8M e 4F) e G4 24 (16M e 8F) indivíduos, utilizando sempre a proporção 2:1 machos:fêmea. Os valores estão expressos na forma de média. Barras representam o erro padrão. Letras minúsculas indicam comparação entre os grupos das fêmeas desovadas (a), letras maiúsculas indicam comparação entre as fêmeas não desovadas (A), letras iguais indicam semelhança entre os grupos (P<0,05). Teste One Way ANOVA.

Figura 6. Níveis plasmáticos de E2 (ng /mL) (A) e DHP (ng/mL) (B), em *A. altiparanae* utilizando a densidade de 12 animais e diferentes proporções sexuais

(Macho:Fêmea): G1 (1M:1F), G2 (2M: 1F), G3 (3M: 1F), G4 (1M: 2F), G5 (1M: 3F), no controle 1 G6 (12F) (100% fêmeas) as fêmeas foram injetadas com EHC, já no controle 2 G7 (12F) as fêmeas não foram injetadas com EHC. Os valores estão expressos na forma de média. Barras representam o erro padrão. Letras minúsculas indicam comparação entre os grupos das fêmeas desovadas (a), letras maiúsculas indicam comparação entre os grupos das fêmeas não desovadas (A), letras iguais indicam semelhança entre os grupos ($P<0,05$). Teste One Way ANOVA.

Figura 7. Frequência dos diferentes estágios de maturação dos oócitos (%), entre as fêmeas desovadas (A) e fêmeas não desovadas (B) de *A. altiparanae*, utilizando diferentes densidades de estocagem : G1: 3 (2M e 1F), G2: 6 (4M e 2F), G3: 12 (8M e 4F) e G4: 24 (16M e 8F) indivíduos. As estruturas foram classificadas da seguinte forma: Oócito pré-vitelogênico (PV); Oócito alvéolo cortical (AC), Oócito vitelogênico incompleto (VI); Oócito vitelogênico completo (VC); Folículo pós-ovulatório (FPO); Óócito com quebra da vesícula germinativa (GVBD); Tecido intersticial (TI); Oócito atrésico (AT). Os valores estão expressos na forma de média. Barras representam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P<0,05$). Teste One Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Figura 8. Frequência dos diferentes estágios de maturação dos oócitos (%), entre as fêmeas desovadas (A) e fêmeas não desovadas (B) de *A. altiparanae*, utilizando a densidade de 12 animais e diferentes proporções sexuais (Macho:Fêmea): G1 (1M:1F), G2 (2M: 1F), G3 (3M: 1F), G4 (1M: 2F), G5 (1M: 3F), no controle 1 G6 (12F) (100% fêmeas) as fêmeas foram injetadas com EHC, já no controle 2 G7 (12F) as fêmeas não foram injetadas com EHC. As estruturas foram classificadas da seguinte forma: Oócito pré-vitelogênico (PV); Oócito alvéolo cortical (AC), Oócito vitelogênico incompleto (VI); Oócito vitelogênico completo (VC); Folículo pós-ovulatório (FPO); Oócito com quebra da vesícula germinativa (GVBD); Tecido intersticial (TI); Oócito atrésico (AT). Os valores estão expressos na forma de média. Barras representam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P<0,05$). Teste One Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros reprodutivos de *Astyanax altiparanae* induzidos com EHC, com diferentes densidades de estocagem (Experimento 1).

Tabela 2. Parâmetros reprodutivos de *Astyanax altiparanae* induzidos com EHC, utilizando a densidade de 12 animais e diferentes proporções sexuais.

RESUMO

Nosso objetivo foi avaliar o efeito das diferentes densidades de estocagem e proporções sexuais sobre o desempenho reprodutivo da espécie *Astyanax altiparanae* em sistema semi-natural. Foram realizados dois experimentos distintos, para o primeiro objetivo testamos quatro densidades de estocagem (3; 6; 12; 24 indivíduos) com quatro réplicas, mantendo sempre a proporção sexual de dois machos para uma fêmea. Quando o efeito da proporção sexual foi avaliado, utilizamos cinco proporções diferentes (1:1; 2:1; 3:1; 1:2; 1:3; macho: fêmea) e dois controles com três repetições, respeitando a densidade de 12 indivíduos em cada unidade experimental. Em ambos os experimentos os tratamentos foram comparados pelo desempenho reprodutivo por meio de variáveis como: a sobrevivência dos reprodutores, a proporção de réplicas com desovas, o volume de desova, percentual médio de fêmeas desovadas por réplica, taxas de fertilidade e eclosão, número de embriões obtidos por tratamento, histologia dos ovários e concentrações plasmáticas dos esteroides sexuais. A densidade não influenciou de forma negativa no desempenho reprodutivo da espécie, sendo observados os melhores desempenhos para as variáveis: volume médio de desova considerando apenas as réplicas onde houve desova $131,50 \pm 33,17$ ml e no número médio de embriões viáveis $73819,2 \pm 20462,1$, nas unidades com maior densidade (24) animais. Notamos desempenhos muito semelhantes quando as diferentes proporções foram testadas, sendo a variável volume relativo de desova na qual a proporção de (3 machos: 1 fêmea) se mostrou mais eficiente que as demais $1,41 \pm 0,84$ ml/g. Sugerimos a utilização da densidade de 24 animais e a proporção de (3 machos: 1 fêmea) visando maior produtividade em um curto período de tempo e trabalho aliada a um menor consumo de hormônio, respeitando as condições aqui propostas.

Palavras chave: reprodução induzida, parâmetros reprodutivos, hormônios esteroides, reprodutores.

ABSTRACT

Our objective was to evaluate the effect of different storage densities and sexual proportions on the reproductive performance of the species *Astyanax altiparanae* in a semi-natural system. Two different experiments were carried out. For the first objective, we tested four stocking densities (3; 6; 12; 24 individuals) with four replicates, always maintaining the sex ratio of two males to one female. When the sex ratio effect was evaluated, we used five different ratios (1: 1, 2: 1, 3: 1, 1, 2, 1: 3, male: female) and two controls with three replicates, respecting the density of 12 individuals in each experimental unit. In both experiments the treatments were compared by reproductive performance using variables such as: reproductive survival, proportion of replicates with spawning, spawning volume, mean percentage of spawned females per replicate, fertility and hatching rates, number treatment embryos, ovarian histology, and plasma steroid plasma concentrations. The density did not negatively influence the reproductive performance of the species, with the best performances for the variables: average spawning volume considering only spawning replicates of 131.50 ± 33.17 ml and the average number of viable embryos 73819.2 ± 20462.1 , in the units with higher density (24) animals. We observed very similar performances when the different proportions were tested, being the relative variable spawning volume in which the proportion of (3 males: 1 female) was more efficient than the other 1.41 ± 0.84 ml / g. We suggest the use of the density of 24 animals and the proportion of (3 males: 1 female) aiming for a greater production in a short period of time and work combined with a lower consumption of hormone, respecting the conditions proposed here.

Key-Words: induced reproduction, reproductive parameters, steroid hormones, breeders.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Astyanax* (Pisces, Characiformes) está amplamente distribuído pela região neotropical e abrange mais de 100 espécies e subespécies (GARUTTI; BRITSKI, 1997). *Astyanax* vem sendo considerado um dos mais complexos gêneros de Characidae nativos da América do Sul (ZANATA; 1995) e muitas de suas espécies possuem atributos biológicos adequados para o cultivo em cativeiro (SUSSEL, 2012). Estas espécies tem despertado crescente interesse de mercado, pois podem ser usadas tanto para consumo direto (como petisco ou na forma de conservas), aproveitado como alimento natural ou forragem na criação de peixes carnívoros, como larvófagos no combate às larvas de pernilongos (GARUTTI, 2000; SATO et al., 2006), comercializados como isca viva para a pesca esportiva (PORTO-FORESTI et al., 2010) e também vem sendo utilizado como modelo experimental (DRUMMOND et al., 2000; GOMES et al., 2013). Dentre as espécies, destaca-se o lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), inserido em aproximadamente 110 empreendimentos em território nacional e cuja produção está em ascensão passando de 5 milhões de peixes em 2008 para 90 milhões em 2015 e o estado de São Paulo destaca-se como o maior produtor, com 90 milhões por ano, seguido por Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás e Paraná (SUSSEL, 2015).

A espécie *A. altiparanae* é considerada uma ótima opção dentre as espécies nativas de interesse para a aquicultura, possivelmente por suas características zootécnicas tais como alta prolificidade, rusticidade e facilidade de manejo (PORTO-FORESTI et al., 2010) e pode ser reproduzida durante todo o ano em condições controladas em laboratório (BRAMBILA-SOUZA et al., 2019). Sua maturidade reprodutiva se inicia a partir dos quatros meses de idade, quando os machos apresentam cerca de 7 a 9 cm de comprimento e as fêmeas 9 e 12 cm, sendo os machos apresentando como característica seu corpo alongado e espículas ásperas em sua nadadeira anal, já as fêmeas apresentam ventre abaulado, papila urogenital pronunciada e avermelhada (PORTO-FORESTI et al., 2010).

Dentre os sistemas para a reprodução em cativeiro das espécies nativas de peixes, desta-se o sistema semi-natural que possui como característica a pouca interferência humana no processo reprodutivo, e nele é simulado condições que

mais se assemelham as naturais (MURGAS et al., 2012). Nesta metodologia reprodutiva as matrizes e os reprodutores após induzidos, são colocados em tanques que são adaptados de acordo com a espécie que se deseja reproduzir, lá ocorre diretamente a fertilização dos ovócitos pelos machos de forma aleatória (ZANIBONI-FILHO; NUÑER, 2004). Neste sistema ocorre uma menor mortalidade, maiores taxas fertilização dos ovos e uma melhor conservação da variabilidade genética da progênie quando comparada com o sistema de extrusão (LOPERA-BARRERO et al., 2010), tendo em vista estas vantagens justifica-se a utilização deste sistema.

No Brasil a aplicação de extrato hipofisário de carpa (EHC) destaca-se como meio mais utilizado para indução, maturação final e desova (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007; WEBER et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2016; BERTOLINI et al., 2017; FERREIRA DO NASCIMENTO et al., 2017). Esta técnica vem sendo utilizada desde a década de 1930 (VON IHERING, 1936) e embora seja uma metodologia altamente difundida, especialmente entre peixes tropicais migradores, ainda apresenta problemáticas e incertezas tais como uma grande heterogeneidade com relação ao número de fêmeas que respondem de forma positiva ao tratamento hormonal, a ovulação parcial e a retenção de ovócitos maduros na papila urogenital das fêmeas (CRISCUOLO-URBINATI, 2012; HAINFELLNER et al., 2012;; PEREIRA et al., 2017). Além dos problemas associados às fêmeas, o uso EHC apresenta outros obstáculos tais como: a presença de outros tipos de hormônios, a variação na concentração de gonadotropinas e potencial para transmissão de enfermidades (ZOHAR; MYLONAS, 2001). Estes entraves ocasionam perdas econômicas, comprometimento do plantel e perda de material genético. Associado a estes fatos, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) proibiu em determinadas ocasiões a utilização de EHC em muitos estados brasileiros (VIVEROS et al., 2013). Ainda neste contexto, devem ser observados também alguns outros fatores que contribuem negativamente para o processo de desova induzida, tais como: a falta de informações básicas sobre a biologia das espécies (principalmente de caráter científico), a falta de informações sobre a influência do clima sobre o processo reprodutivo e falhas no manejo dos reprodutores ao longo do ano e durante o processo de indução hormonal (GUERREIRO et al., 2009; MYLONAS et al., 2010; BOBE; LABBÉ, 2010).

De modo geral, o ciclo reprodutivo em teleósteos é controlado pelo sistema endócrino que, mais especificamente pelo eixo hipotálamo – hipófise – gônadas, onde hormônios são sintetizados e liberados para atuarem e promoverem diversas etapas do processo reprodutivo (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008; GUERRERO et al., 2009; BOBE; LABBÉ, 2010; DUFOUR et al., 2010; LUBZENS et al., 2010; MYLONAS et al., 2010; SCHULZ et al., 2010; ZOHAR et al., 2010). Este processo ocorre em consonância com flutuações de fatores ambientais tais como: fotoperíodo, temperatura e parâmetros físicos e químicos da água (pH, condutividade, volume, transparência) (TYLER; SUMPTER, 1996; TRUDEAU, 2006). Dois dos fundamentais “transdutores” endócrinos destas variações ambientais são o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e a dopamina (DA). O primeiro é considerado maior indutor da secreção das gonadotrofinas (GtHs) e a DA parece controlar de forma inibitória as ações do GnRH (DUFOUR et al., 2010). As GtHs são sintetizadas na hipófise e tem papel fundamental no controle da reprodução. O hormônio folículo estimulante (FSH) possui papel importante sobre o controle e estimulação da gametogênese (vitelogênese e espermatogênese) e o hormônio luteinizante (LH) atua na regulação e promoção da maturação final dos oócitos, na ovulação e no processo de espermiacão (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008; GUERRERO et al., 2009; LUBZENS et al., 2010; MYLONAS et al., 2010; SCHULZ et al., 2010). Neste contexto, a maturação final é caracterizada pela quebra da vesícula germinativa (GVBD), condensação cromossômica e extrusão do primeiro corpúsculo polar, é um pré-requisito para que a ovulação ocorra. A ação do FSH e do LH sobre os ovários se dá principalmente sobre as células da teca e da granulosa, estimulando a síntese de testosterona (T), estradiol (E_2) e progestágenos.

Sabe-se que o E_2 é um hormônio esteroide associado com a vitelogênese e que picos do esteroide gonadal $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) estão associados com a maturação dos ovócitos e ovulação (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008). Estudos realizados em carpas demonstraram que durante o processo de hipofisação ocorre uma transição entre a síntese de E_2 para DHP do início para o final do processo, a qual está associada a uma ovulação bem-sucedida (LEVAVI-ZERMONSKY; YARON, 1986; CHAUBE et al., 2014). Além disso, este processo designado como “stereoidogenic shift” ocorre com a aplicação de duas doses de

hormônio (LEVAVI-ZERMONSKY; YARON, 1986), mas não em dose única, justificando o uso de doses fracionadas na vasta maioria das espécies. Mesmo assim, o processo denominado como “stereoidogenic shift” não foi descrito como condicionante à maturação final e ovulação em algumas espécies de peixes analisadas (LISTER; VAN DER KRAAK, 2008; PODHOREC et al., 2016).

Portanto, os mecanismos associados com uma ovulação bem-sucedida permanecem pouco elucidados para a vasta maioria das espécies de peixes. Neste contexto, as interações inter e intra-sexuais (densidades e proporções sexuais, por exemplo) também possuem relação direta com a desova bem-sucedida, modulando o comportamento reprodutivo, o que é de extrema importância para o reconhecimento específico, sinalização reprodutiva, avaliação e seleção sexual e sincronização da reprodução (THOMPSON et al., 2004). Para garantir o sucesso reprodutivo de uma espécie em cativeiro é essencial conhecer sua biologia reprodutiva, para o desenvolvimento de pacotes tecnológicos e estabelecer metodologias de produção, já que a eficiência reprodutiva é relacionada a diversos fatores que atuam em conjunto, dentre os quais, podemos salientar os cuidados que vão desde o manejo e manutenção dos reprodutores no período pré-reprodução até cuidados pós-fertilização (MURGAS et al., 2012).

Uma variável importante relacionada ao sucesso reprodutivo em vertebrados é a densidade reprodutiva (WYNNE-EDWARDS, 1962; Brown, 1969; VERNER, 1977). Esta variável é um importante fator biológico, pois visando pelo lado produtivo atua diretamente sobre a sobrevivência e o desenvolvimento dos peixes, sendo necessária a determinação de seus efeitos e implementação de taxas adequadas que variam demasiadamente de espécie para espécie (SOARES, 2002). A densidade é facilmente manipulada, e segundo alguns autores está ligada a aspectos fisiológicos e comportamentais (BROWN, 1969; ARCHER, 1970; WATSON; MOSS, 1970). O aumento na densidade de estocagem é um dos aspectos que permite a intensificação na produção de peixes (KUPREN et al., 2008), no entanto este aumento na densidade de estocagem se justifica até que não ocorra redução no desempenho produtivo ou comprometimento na sanidade dos animais (NAGATA, 2010).

O efeito das diferentes proporções macho: fêmea sobre o desempenho reprodutivo de espécies submetidas a desova em sistema seminatural é pouco explorado. Diferentes proporções de machos para fêmeas de lambaris em sistema

seminatural já foram utilizadas em experimentos anteriores para desova em cativeiro: 4:3 (REZENDE et al., 2005), 40:25 (SATO et al., 2006), 8: 16 (LIRA, 2018), 5:4 (ARIKI et al., 2017), e a mais empregada comumente 10:5 (ABREU et al., 2017; SILVA et al., 2017; BRAMBILA-SOUZA et al., 2019). No entanto, a proporção sexual foi definida para cada trabalho sem ser uma variável ou uma hipótese a ser testada. Em nosso laboratório, trabalhos em desenvolvimento tem mostrado que fêmeas de lambari tanto induzidas com diferentes dosagens de (EHC) (ARIKI et al., 2017), como sGnRH (ABREU et al., 2017) ou até mesmo extrato de hipófise de lambari (SILVA et al., 2017), as fêmeas de lambari apresentam elevada heterogeneidade no desempenho reprodutivo. Nos mesmos experimentos, observamos algumas vezes uma mortalidade pronunciada de machos, aspecto esse que não sabemos se é devido às densidades aplicadas, a proporção sexual, a dose hormonal ou a algum outro fator desconhecido. Tampouco sabemos se estes fatores mencionados interferem no pareamento de machos e fêmeas e no desempenho reprodutivo provocando alterações no número de larvas obtidas. No entanto, é razoável supor ao menos que a mortalidade de machos deve interferir diretamente no número de larvas obtidas pela escassez / ausência dos gametas masculinos no momento da fertilização. Estes problemas estão na base da consolidação da exploração aquícola da espécie, pois reduzem de forma marcante o potencial reprodutivo da espécie e a oferta constante de alevinos.

Neste contexto, destacamos que praticamente toda a produção nacional de peixes nativos depende de EHC (MPA 2013; FAO 2014). Para estas espécies e incluindo o lambari, diferente de muitas espécies marinhas (ROSENFELD et al., 2012; FERNANDEZ-PALACIOS et al., 2015) e de regiões temperadas (SZABO et al., 2002; GENZ et al., 2014), a reprodução em cativeiro é obtida com a injeção de EHC (DE SOUZA et al., 2015; CANEPPELE et al., 2015; ITTZES et al., 2014; KURADOMI et al., 2017; PEREIRA et al., 2017). Portanto, dada a dependência que a produção de peixes nativos ainda apresenta à técnica de hipofisação e ao escasso conhecimento sobre as disfunções reprodutivas nos peixes migratórios sul-americanos (CRISCUOLO-URBINATI et al., 2012; HAINFELLNER et al., 2012; KURADOMI et al., 2015), o aprimoramento do desempenho reprodutivo destas espécies depende de informações básicas de seu manejo reprodutivo em laboratório. Assim, destacamos que pouco se conhece sobre a reprodução do

lambari-do-rabo-amarelo em cativeiro, tanto que é comum relatos de problemas na reprodução induzida, tanto de produtores quanto pesquisadores, sendo uma das principais queixas a mortalidade de machos durante a reprodução em cativeiro, possivelmente associadas às inadequadas densidades e proporções sexuais aplicadas.

Este estudo foi composto por dois objetivos principais relacionados a necessidade de se melhorar o desempenho reprodutivo de *Astyanax altiparanae* submetidos a desova induzida em laboratório. No primeiro objetivo, determinamos o número adequado de peixes a serem mantidos em unidades experimentais de (40 x 28 x 14 cm) e preenchidas até 10L, as quais são utilizadas rotineiramente no Laboratório de Reprodução de Peixes do CAUNESP e que possuem similaridade com sistemas utilizados por alguns produtores desta espécie. Para o segundo objetivo, comparamos a influência das diferentes proporções sexuais (machos: fêmeas) sobre o desempenho reprodutivo da espécie. Testamos a hipótese que a densidade estocagem e proporção sexual estariam ligadas diretamente a um melhor desempenho reprodutivo da espécie. Desta forma avaliamos se um maior adensamento influenciaria negativamente no desempenho reprodutivo e na sobrevivência dos reprodutores e testamos qual a proporção sexual mínima necessária para a obtenção de um maior número de embriões viáveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados machos e fêmeas adultos da espécie *Astyanax altiparanae* de aproximadamente 6 meses de idade, comprimento ($9,26 \pm 0,52$ cm fêmeas e $8,23 \pm 6,70$ cm machos), massa média ($12,10 \pm 2,15$ gr fêmeas e $8,60 \pm 0,46$ g machos), oriundos de um lote formado a partir de exemplares selvagens capturados da Bacia do Rio Sapucaí, São Paulo, Brasil e foram reproduzidos em cativeiro no Laboratório de Reprodução de Peixes do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. O lote foi mantido em viveiro escavado de 200m^3 , com renovação de água constante, arraçoados *ad libitum* sete (07) dias na semana, duas vezes ao dia, 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 e 0,6% de fósforo). Os parâmetros de qualidade de água dos viveiros escavados eram mensurados semanalmente às 07:00 da manhã, com um oxímetro YSI 550a (Yellow Spring Incorporation, pHgâmetro K39-0014P (Kasvi) e condutivímetro HI98311 (Hanna Instruments) e a média dos valores ao longo do ano foi de $\text{O}_2=6,80 \pm 2,26$ mg.L⁻¹; pH= $6,83 \pm 0,26$; condutividade= $83,43 \pm 28,67$ $\mu\text{S.cm}^{-1}$ e T= $25,34 \pm 2,95$ °C.

2.1. Delineamento experimental e análises

Foram realizados dois experimentos distintos ambos realizados no mês de novembro de 2017 e as análises foram feitas da mesma forma para os dois experimentos. Os experimentos foram inteiramente casualizados, nos quais se utilizaram 550 exemplares sendo 100 fêmeas e 150 machos no (experimento 1) e 150 fêmeas e 150 machos no (experimento 2), as fêmeas foram selecionadas com base em aspectos externos como ventre abaulado, papila urogenital dilatada e avermelhada, e nos machos notou-se a presença de espícula na nadadeira anal (nos machos), características de indivíduos aptos à reprodução. Em seguida, os animais foram transportados para o laboratório, separados por sexo, aclimatados e mantidos em caixas de 750 litros em um sistema de recirculação fechado com temperatura e fotoperíodo controlados. Após a seleção, os peixes foram distribuídos em unidades experimentais com dimensões de (40 x 28 x 14) cm preenchidas até

10L com fluxo constante de água, na qual possuía uma rede de malha 0,5 mm para coleta de ovos na parte externa. Os peixes foram distribuídos nas unidades experimentais de acordo com os grupos experimentais definidos para cada experimento.

2.2. Experimento 1: Efeito da densidade de estocagem

No experimento 1 foram empregados quatro tratamentos com quatro repetições cada (4x4), utilizando a proporção 2:1 machos (M) : fêmea (F), e os tratamentos foram constituídos variando a densidade de indivíduos estocada em cada unidade experimental: grupo 1 (G1): 3 indivíduos (2M e 1F), grupo 2 (G2): 6 (4M e 2F), grupo 3 (G3): 12 (8M e 4F) e grupo 4 (G4): 24 (16M e 8F).

Para induzir a maturação final e ovulação dos animais selecionados foi empregada a dosagem de 6 mg.kg⁻¹ de EHC (Extrato de Hipófise de Carpa), 10% (0,6 mg/kg⁻¹) e 90% (5,4 mg/kg⁻¹) respectivamente na primeira e segunda dose sendo intervalo de 12 horas nas fêmeas (12h10 e 00h10) e 3mg. kg⁻¹ de EHC nos machos no momento da segunda dose, ambos diluídos em solução salina (0,9%) na proporção de 100 µL para cada 10g de massa e injetados intraperitoneal. As desovas ocorreram de forma seminatural, e de 30 em 30 minutos as unidades experimentais foram analisadas para observar a presença ou não de ovos. Desta forma, os ovos foram coletados de cada réplica e foi medido o volume de ovos, posteriormente 10mL de ovos de cada réplica foram transferidos para incubadoras cônicas de 7 L com fluxo de água constante. Foi estipulado como tempo final, o período de 7 horas após a segunda dose da indução hormonal, período conhecido em que as fêmeas desovam nas condições deste trabalho, pois em estudos prévios realizados em nosso laboratório as fêmeas de *A. altiparanae* iniciaram a desova com 144 horas-grau em torno de 5 horas após a indução à 26,0 °C. Foi determinado para todas as fêmeas a ocorrência ou não de desova, mediante a observação das características externas, consideramos como fêmea desovada aquela que apresentou ventre flácido, retração do contorno externo do abdômen e confirmado por histologia dos ovários. Foram registrados os seguintes dados biométricos: massa (g) e comprimento total (cm). Após as análises biométricas as fêmeas foram anestesiadas em solução de Benzocaína (100 mg/L⁻¹⁰), e amostras de sangue foram coletadas por punção pericutânea da veia caudal com auxílio de agulhas e seringas

descartáveis contendo heparina sódica. As amostras foram transferidas para microtubos e centrifugadas à 1000 x g por 15 minutos à 4°C para separação do plasma, e posteriormente armazenado em ultrafreezer -80°C. Em seguida, as fêmeas foram eutanasiadas por secção da medula espinhal na altura do opérculo e tiveram os ovários coletados. Para coleta dos ovários foi feita uma incisão ventral no sentido caudo-cranial a partir do poro urogenital, os ovários foram retirados e pesados para o cálculo do Índice gonadossomático (IGS), utilizou-se a seguinte fórmula: $[(\text{peso das gônadas} / \text{peso corporal}) \times 100]$ para determinação do IGS. Amostras dos ovários (porções anterior, média e caudal), foram fixadas em solução de Karnovsky (4% paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão fosfato Sorensen a 0,1 M e pH 7,2). As amostras de ovário coletadas foram embebidas utilizando kit de historesina (Technovit 7100, Kulzer Histo-Technik), e cortadas em secções de 3 µm de espessura utilizando micrótomo. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-floxina (HF).

2.3. Desempenho reprodutivo

O desempenho reprodutivo foi avaliado considerando os seguintes parâmetros: sobrevivência média dos reprodutores: $[\text{número inicial de reprodutores} / \text{número final de reprodutores} \times 100]$, proporção de réplicas com desovas, volume médio de desova considerando todas as réplicas: $[\text{volume total de ovos} / \text{número total de réplicas}]$, volume médio de desova considerando apenas as réplicas onde houve desova: $[\text{volume total de ovos} / \text{número total de fêmeas que desovaram na respectiva réplica}]$, volume total de desova somando todas as réplicas de cada tratamento, volume relativo de desova: $[\text{volume de ovos da réplica (mL)} / \text{peso das fêmeas (g) da réplica}]$, fração de fêmeas desovadas em cada réplica, percentual médio de fêmeas desovadas por réplica, taxa média de fertilização (percentual de oócitos fertilizados e viáveis) e taxa média eclosão (percentual de larvas que eclodirão) foram estimadas avaliando amostras com aproximadamente 100 ovos de cada incubadora. Cerca de 90 UTA após a desova, as amostras foram coletadas nestes tempos pois é aproximadamente o momento do desenvolvimento embrionário que ocorre o fechamento do blastóporo, que é um bom indicativo da qualidade dos gametas e da fertilização. Em um estereomicroscópio LEICA M50 (LEICA Microsystems, Wetzlar, Alemanha) estes ovos foram contados e

classificados pela presença ou ausência de desenvolvimento embrionário (viáveis e não viáveis, respectivamente). Da mesma forma, foram coletadas amostras para a estimativa da taxa de eclosão quando foi observado movimento da cauda dos embriões antes da eclosão (o que assumimos ser um embrião viável que iria eclodir em breve). Foram utilizadas as seguintes formulas, taxa de fertilidade: [número de ovos viáveis / número total de ovos* 100] e eclosão [número de larvas antes de eclodir / número total de ovos *100. Além disso, foi determinado o número médio de embriões viáveis por réplica: [média obtida dos valores do volume de desova das réplicas de cada tratamento x o valor de 720 ovos.mL⁻¹ (valor médio obtido pela contagem das amostras de 1mL de ovos) x a taxa média de eclosão de cada réplica] e número total de embriões viáveis obtidos por tratamento: [soma dos valores obtidos do volume de desova das réplicas de cada tratamento x o valor de 720 ovos.mL⁻¹ x a taxa média de eclosão de cada réplica].

2.4. Análise descritiva e da densidade de volume (frequência percentual) dos diferentes estágios de maturação dos oócitos

Para a análise de densidade de volume, aplicamos a mesma metodologia utilizada por CRISCUOLO-URBINATI et al., (2012) com algumas adaptações. Resumidamente, foram considerados os seguintes tipos de estruturas: oócitos previtelogênicos (PV), oócitos alvéolos corticais (AC), ovócitos vitelogênicos incompletos (VI), oócitos vitelogênicos completos (VC), oócitos com a quebra da vesícula germinativa (GVBD), folículos pós ovulatorios (FPO), oócitos atrésicos (AT) e tecido intersticial (TI) (Figura 1). Os artefatos eram raros e não foram incluídos na contagem. A densidade de volume ocupada por cada estrutura foi determinada. Para tanto, foram utilizados três campos microscópicos (5 x objetiva) de três regiões ovarianas (totalizando nove campos microscópicos ovarianos). As contagens foram realizadas em uma grade de 352 pontos (Figura 2). O número de pontos de cada uma das estruturas acima mencionadas foi utilizado para determinar as suas frequências (nº pontos / pontos totais * 100). Uma vez que em todos os tratamentos tivemos fêmeas que apresentaram desova e fêmeas que não desovaram, os grupos desovadas e não desovadas foram separados e analisados separadamente.

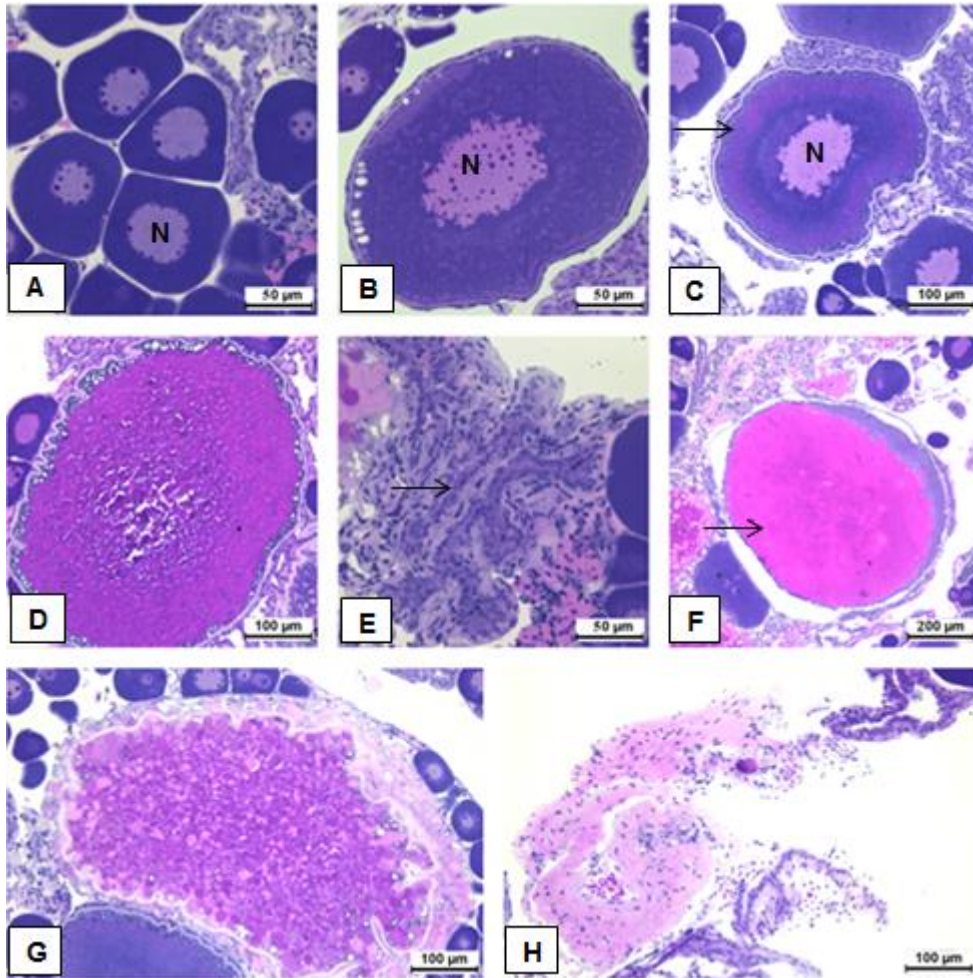


Figura 1. Classificação dos oócitos encontradas em diferentes estágios da maturação em *A. altiparanae*. A: oócito pré-vitelogênico (PV), B: oócito alvéolo cortical (AC), C: oócito vitelogênico incompleto (VI)(seta), D: oócito vitelogênico completo (VC), E: folículo pós-ovulatório (FPO)(seta), F: oócito com quebra da vesícula germinativa (GVBD)(seta), G: oócito atrésico (AT), H: tecido intersticial (TI). Abreviações: núcleo (N). Coloração: Hematoxilina/Floxina.

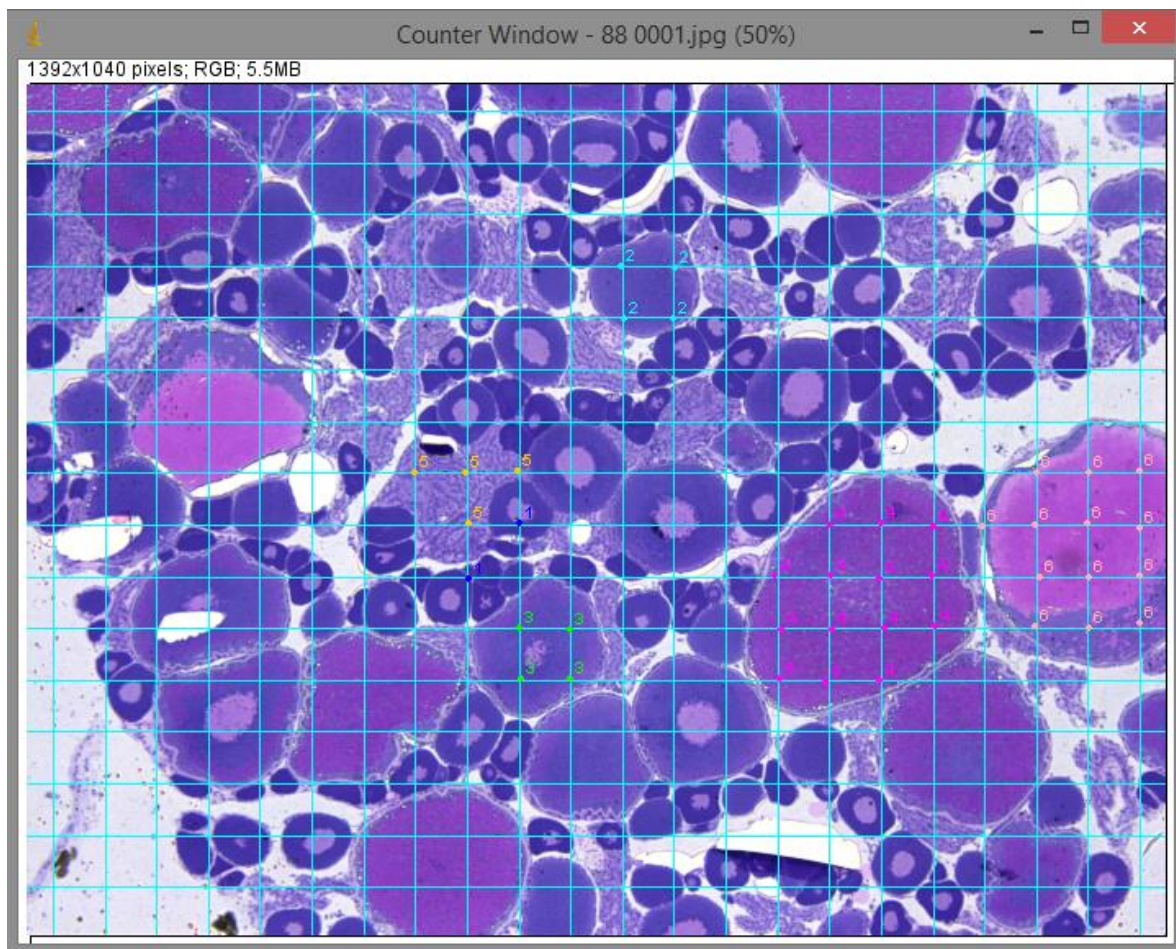


Figura 2. Exemplo do grid de 352 pontos aplicado sobre as fotomicrografias dos cortes histológicos para análise frequência percentual dos diferentes estágios de maturação dos oócitos. Coloração: Hematoxilina/floxina.

2.5. *Hormônios esteroides*

As concentrações plasmáticas de 17β -estradiol (E_2) e 20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) foram quantificadas e determinados pelo método de ELISA utilizando kits comerciais (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram realizadas em duplicata, e a validação dos kits foi determinada através do cálculo da variação intra e interplacas. As variações limites intra e interplacas dos kits para este estudo foram de 20%. Uma vez que em todos os tratamentos tivemos fêmeas que apresentaram desova e fêmeas que não desovaram, os grupos desovadas e não desovadas foram separados e analisados separadamente.

2.6. Experimento 2: Efeito da proporção sexual

No segundo experimento, utilizamos cinco tratamentos e dois controles com três repetições (7x3) e a densidade de 12 indivíduos, e os tratamentos foram assim definidos: (proporção macho: fêmea): G1 (1M:1F), G2 (2M: 1F), G3 (3M: 1F), G4 (1M: 2F), G5 (1M: 3F). Nos controles não haviam machos nas caixas. No controle 1 G6 (12F) as fêmeas foram injetadas com EHC e no controle 2 G7 (12F) as fêmeas não foram injetadas. A metodologia utilizada para as análises foram semelhantes as descritas anteriormente no experimento 1.

2.7. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando os softwares Statistica v.10.0 ou SAS (Statistical Analysis Software v.9.4). Os dados foram testados para os pressupostos de normalidade e homocedasticidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene respectivamente. Todos os testes foram realizados com o nível de significância $\alpha=0,05$.

Os valores obtidos para as variáveis de desempenho reprodutivo foram comparados pelos testes One-Way ANOVA seguido do teste Tukey HSD (*honestly significant difference*) para as variáveis paramétricas e os dados foram representados por média \pm DP (desvio padrão) ou Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas e expressos na forma de mediana \pm DP. Foram comparadas também por método de regressão linear polinomial as variáveis de volume médio de desova considerando todas as réplicas pelo número total de peixes nas unidades (Experimento 1) e volume médio de desova considerando todas as réplicas pelo número de machos e pelo número de fêmeas (Experimento 2).

Os níveis plasmáticos de E2 e DHP, as análises dos diferentes estágios de maturação dos oócitos e o IGS, foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey e os dados foram representados por média \pm EP (erro padrão), o IGS foi representado por média \pm DP, não foram incluídas nas análises o grupo 1 (Experimento 1 – Densidade) das fêmeas (Não desovadas) pois o grupo 1 apresentou apenas fêmea não desovada, da mesma forma os dados das

fêmeas (Não Desovadas) do Grupo 3 (Experimento 2 Proporção), não foram incluídos na análise pois houve somente uma fêmea não desovada.

2.8. Aprovação do uso de animais em pesquisa:

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Câmpus de Jaboticabal-SP (protocolo nº 008106/18), de acordo com os preceitos de lei e normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3. RESULTADOS

Os valores médios dos parâmetros químicos e físicos da água, no laboratório durante os períodos experimentais foram de: $27,9 \pm 0,50^{\circ}\text{C}$ de temperatura; $6,83 \pm 0,03$ de pH; $7,4 \pm 0,28$ mg/L de O₂ dissolvido; $95,30 \pm 8,70$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ de condutividade (Experimento 1) e $27,9 \pm 0,50^{\circ}\text{C}$ de temperatura; $6,71 \pm 0,55$ de pH; $7,20 \pm 0,9$ mg/L de oxigênio dissolvido; e $45,50 \pm 7,2$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ de condutividade (Experimento 2).

Os parâmetros reprodutivos estão descritos nas respectivas tabelas (Tabela 1: Experimento 1 Densidade de estocagem) e (Tabela 2: Experimento 2: Proporção sexual). Estatisticamente na tabela 1 o G4 se mostrou superior aos demais grupos nas variáveis: volume médio de desova considerando todas as réplicas, volume médio de desova considerando apenas as réplicas onde houve desova e número médio de embriões viáveis por réplica, fato que se explica pelo maior número de fêmeas presentes neste tratamento, as demais variáveis não apresentaram diferença ($p > 0,05$). Já na tabela 2, somente o volume relativo do G3 apresentou superior aos demais grupos significativamente ($p > 0,05$).

Pode-se observar que a medida que se aumentava a densidade nas unidades e conseqüentemente o número de fêmeas, as desovas não pararam e o volume de desova também não era reduzido seguindo de acordo com a regressão linear esperada em algumas réplicas (Figura 3). Na (Figura 4 A) notamos uma regressão cúbica quando comparamos se a medida que a quantidade de machos aumentava, influenciaria no volume de ovos (mL), fato que pode ser explicado pelo número

inversamente proporcional de machos para as fêmeas. Nas proporções em que os machos eram em quantidades inferiores, um maior volume de desova foi observado, pois proporcionalmente as fêmeas eram em maior número. Já quando comparamos se o volume de desova era influenciado pelo número de fêmeas não se aplicou regressão (Figura 4 B).

O IGS no experimento 1 das fêmeas desovadas G1: $(1,97 \pm 0,46)$; G2: $(1,60 \pm 0,75)$; G3: $(1,82 \pm 1,13)$; e G4 $(1,93 \pm 1,51)$ e não desovadas G1: $(7,05)$; G2: $(18,40 \pm 0,48)$; G3: $(21,13 \pm 5,72)$; e G4: $(12,62 \pm 5,91)$ não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Da mesma forma no experimento 2 as fêmeas desovadas G1: $(3,43 \pm 1,16)$; G2: $(4,17 \pm 2,45)$; G3: $(3,79 \pm 0,77)$; G4: $(4,68 \pm 4,83)$; G5: $(4,01 \pm 1,39)$ e G6: $(7,10 \pm 5,73)$ e as fêmeas não desovadas G1: $(15,87 \pm 3,39)$; G2: $(18,57 \pm 5,49)$; G3: $(12,05)$; G4: $(19,37 \pm 3,19)$; G5: $(19,99 \pm 4,05)$; G6: $(19,12 \pm 4,33)$ e G7: $(17,33 \pm 2,14)$ também não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

As concentrações plasmáticas dos esteroides gonadais estão apresentadas nas respectivas figuras: Estradiol Experimento 1 (Figura 5 A), DHP Experimento 1 (Figura 5 B), Estradiol Experimento 2 (Figura 6 A) e DHP Experimento 2 (Figura 6 B), não houve diferença significativa nas concentrações plasmáticas dos esteroides gonadais em ambos experimentos ($p > 0,05$).

Nas análises dos diferentes estágios de desenvolvimento dos oócitos (Figura 7 A, B) (Experimento 1) o G2 se mostrou igual ao G3 enquanto G4 se mostrou superior a G3 porém semelhante a G2 nos oócitos vitelogênicos incompletos (VI) e nos oócitos com quebra da vesícula germinativa (GVBD) ($p < 0,05$). No (Experimento 2) (Figura. 8 A, B), G5 se mostrou inferior aos outros grupos nos oócitos vitelogênicos incompletos (VI) e superior aos demais grupos nos oócitos com quebra da vesícula germinativa (GVBD), enquanto G2 se mostrou superior aos demais nos oócitos atrésicos ($p < 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros reprodutivos de *Astyanax altiparanae* induzidos com EHC, com diferentes densidades de estocagem (Experimento 1).

	Grupo/Número total de animais por unidade experimental			
	Grupo 1 / 3 animais	Grupo 2 / 6 animais	Grupo 3 / 12 animais	Grupo 4 / 24 animais
Sobrevivência média dos reprodutores (%)	100	100	100	98,96±2,09
Proporção de réplicas com desovas	¾	4/4	4/4	4/4
Volume médio de desova considerando todas as réplicas (mL)	16,88±17,68	39,00±17,45	51,25±13,65	131,50±33,17*
Volume médio de desova considerando apenas as réplicas onde houve desova (mL)	22,50±16,71	39,0±17,45	51,25±13,65	131,50±33,17*
Volume total de desova somando todas as réplicas de cada tratamento (mL)	67,5	156,0	205,0	526,0
Volume relativo de desova (mL/g)	1,70±1,28	1,63±0,60	1,10±0,38	1,34±0,31
Fração de fêmeas desovadas em cada réplica	(1/1)-(1/1)-(0/1)- (1/1)	(2/2)-(2/2)-(1/2)- (1/2)	(2/4)-(2/4)-(3/4)- (3/4)	(7/8)-(8/8)-(7/8)- (6/8)
Percentual médio de fêmeas desovadas por réplica (%)	75,00±50,0	75,00±28,90	62,50±14,43	80,00±18,14
Taxa média de fertilização (%)	86,29±13,49	85,16±7,08	86,51±0,98	80,68±0,76
Taxa média de eclosão (%)	76,92±26,91	78,21±10,69	81,05±10,81	79,71±20,14
Número médio de embriões viáveis por réplica	8934,6±10806,6	22273,5±10600,4	30318,6±10210,0	73819,2±20462,1*
Número total de embriões viáveis obtidos por tratamento	35738,2	89093,9	121274,5	295277,0

Tratamentos: G1: 3 indivíduos (2 machos (M) e 1 fêmea (F)), G2: 6 (4M e 2F), G3: 12 (8M e 4F) e G4: 24 (16M e 8F). Os valores médios estão representados como média ± desvio padrão (DP). Asteriscos (*) indicam diferença estatística (P<0,05). Teste One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Parâmetros reprodutivos de *Astyanax altiparanae* induzidos com EHC, utilizando a densidade de 12 animais e diferentes proporções sexuais.

	Grupo/ Proporção Macho/Fêmea						
	Grupo 1 6/6	Grupo 2 8/4	Grupo 3 9/3	Grupo 4 4/8	Grupo 5 3/9	Grupo 6 12F+	Grupo 7 12F-
Sobrevivência média dos reprodutores (%)	94,44±9,62	91,67±14,43	91,67±8,34	94,44±9,62	97,22±4,81	94,45±4,81	91,67±8,34
Proporção de réplicas com desovas	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Volume médio de desova considerando todas as réplicas (mL)	59,00±31,58	23,00±2,52	25,00±19,50	78,00±25,32	95,00±42,74	18,00±20,61	0,00
Volume médio de desova considerando apenas as réplicas onde houve desova (mL)	59,00±31,58	23,00±2,52	25,00±19,50	78,00±25,32	95,00±42,74	18,00±20,61	0,00
Volume total de desova somando todas as réplicas de cada tratamento (mL)	138,00	68,00	101,00	206,00	214,00	79,50	0,00
Volume relativo de desova (mL/g)	0,63±0,52	0,53±0,29	1,41±0,84*	0,63±0,27	0,60±0,38	0,15±0,11	-
Fração de fêmeas desovadas em cada réplica	(1/6)-(3/6)-(4/6)	(2/4)-(1/4)-(3/4)	(2/3)-(2/3)-(1/3)	(2/8)-(6/8)-(5/8)	(7/9)-(5/9)-(4/9)	(9/12)-(2/12)-(5/12)	(0/12)-(0/12)- (0/12)
Percentual médio de fêmeas desovadas por réplica (%)	44,44±25,46	50,00±25,00	55,56±19,25	54,17±26,02	62,96±12,83	41,67±25,00	0,00

Taxa média de fertilização (%)	87,33±8,55	69,33±29,96	76,84±15,21	75,16±15,21	74,58±7,76	-	-
Taxa média de eclosão (%)	71,33±8,08	57,00±28,62	64,33±25,66	73,00±2,00	64,33±15,70	-	-
Número médio de embriões viáveis por réplica	33984,0±17193,4	7760,0±55431,8	12780,0±15312,5	40996,8±12510,2	41205,6±24488,6	-	-
Número total de embriões viáveis obtidos por tratamento	73368,0	28404,0	52639,2	107582,4	105530,4	-	-

Densidades utilizadas: (macho(s) (M): fêmea(s)(F)): G1 (1M:1F), G2 (2M: 1F), G3 (3M: 1F), G4 (1M: 2F), G5 (1M: 3F), no controle 1 G6 (12F) (100% fêmeas) as fêmeas foram injetadas com EHC, já no controle 2 G7 (12F) as fêmeas não foram injetadas com EHC. Os valores médios de sobrevivência média dos reprodutores, taxas médias de fertilidade e eclosão e volume relativo de desova estão expressos na forma de média±DP, os valores médios de volume médio de desova considerando todas as réplicas, volume médio de desova considerando apenas as réplicas onde ocorreu desova e o número médio de embriões viáveis estão representados como mediana±DP. Asteriscos (*) indicam diferença estatística (P<0,05). Teste One Way ANOVA seguido do teste de Tukey para as variáveis paramétricas e Kruskal-Wallis para as variáveis não paramétricas.

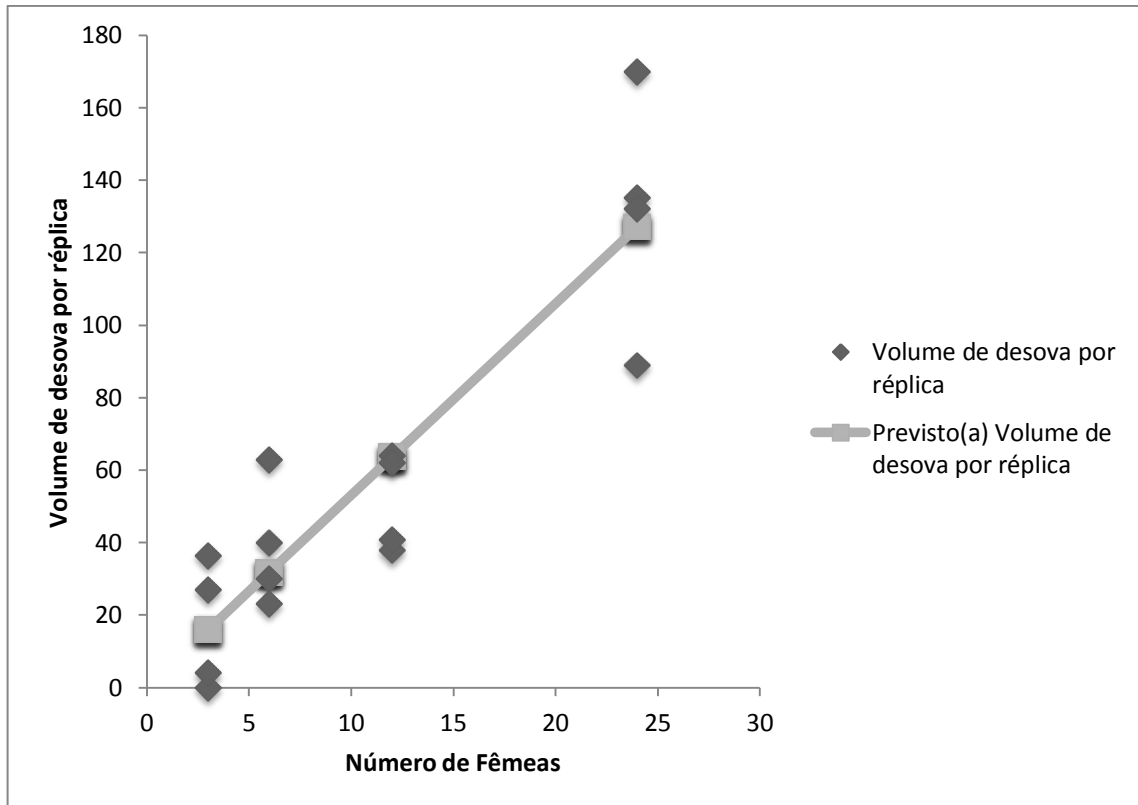


Figura 3. Regressão linear entre o volume médio de desova considerando todas as réplicas pelo número de animais por unidade experimental G1: (4); G2: (8); G3: (16); G4: (24) indivíduos. Cada ponto representa o volume de desova de cada réplica. Regressões lineares foram utilizadas; * $P < 0,05$.

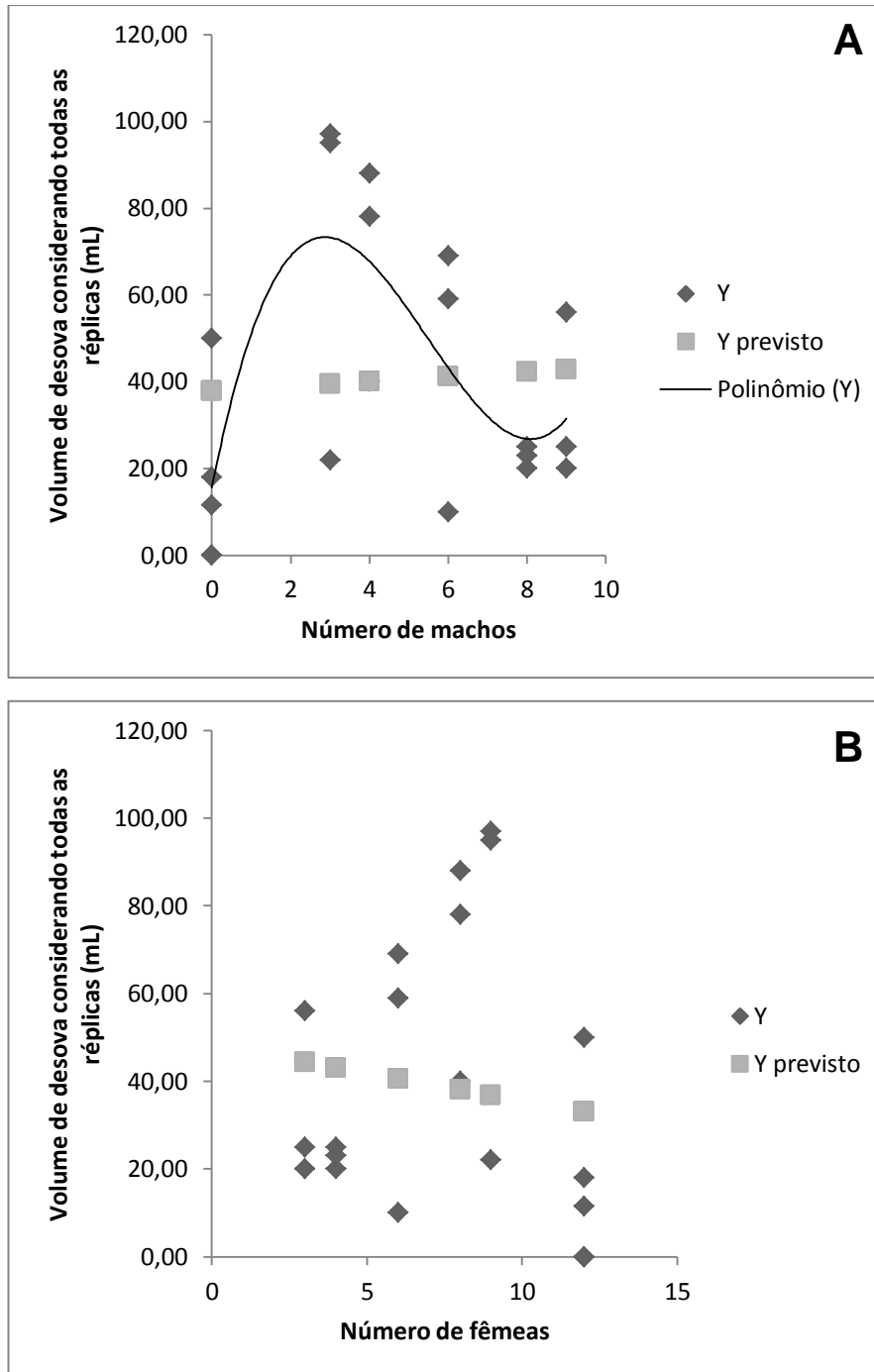


Figura 4. Relação entre o volume médio de desova considerando todas as réplicas e o número de machos (A) e número de fêmeas (B) nas unidades experimentais em *Astyanax altiparanae*. G1: 6M:6F; G2: 8M 4F; G3: 9M:3F; G4: 4M:8F; G5: 3M:9F; G6 12F injetadas; G7: 12F não injetadas. Cada ponto representa o volume de desova de cada réplica. Regreções lineares e cúbicas foram utilizadas; $p > 0,05$.

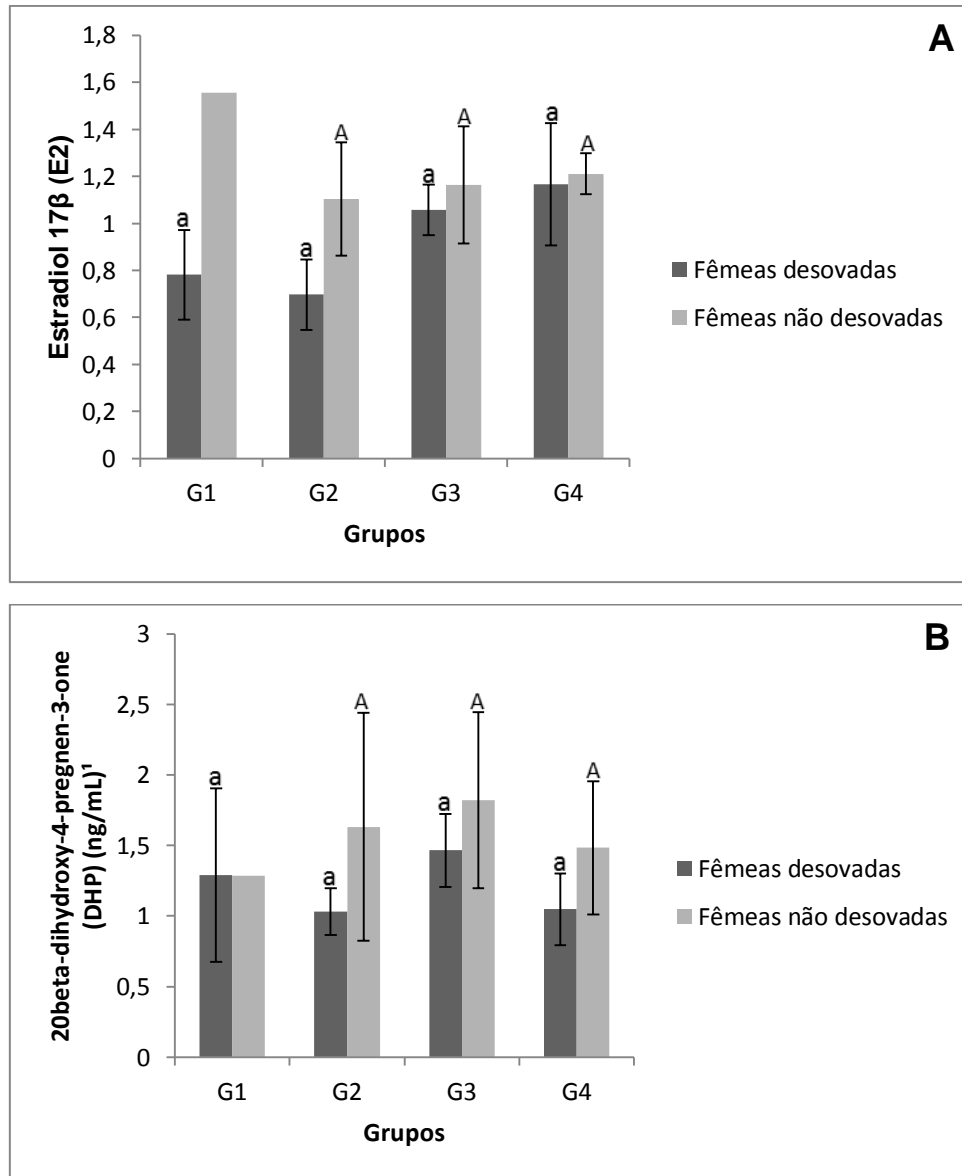


Figura 5. Níveis plasmáticos de E2 (ng /mL) (A) e DHP (ng /mL) (B), em *A. altiparanae* com diferentes densidades de estocagem: G1 (2M e 1F), G2 6 (4M e 2F), G3 12 (8M e 4F) e G4 24 (16M e 8F) indivíduos, utilizando sempre a proporção 2:1 machos:fêmea. Os valores estão expressos na forma de média. Barras representam o erro padrão. Letras minúsculas indicam comparação entre os grupos das fêmeas desovadas (a), letras maiúsculas indicam comparação entre as fêmeas não desovadas (A), letras iguais indicam semelhança entre os grupos ($P < 0,05$). Teste One Way ANOVA.

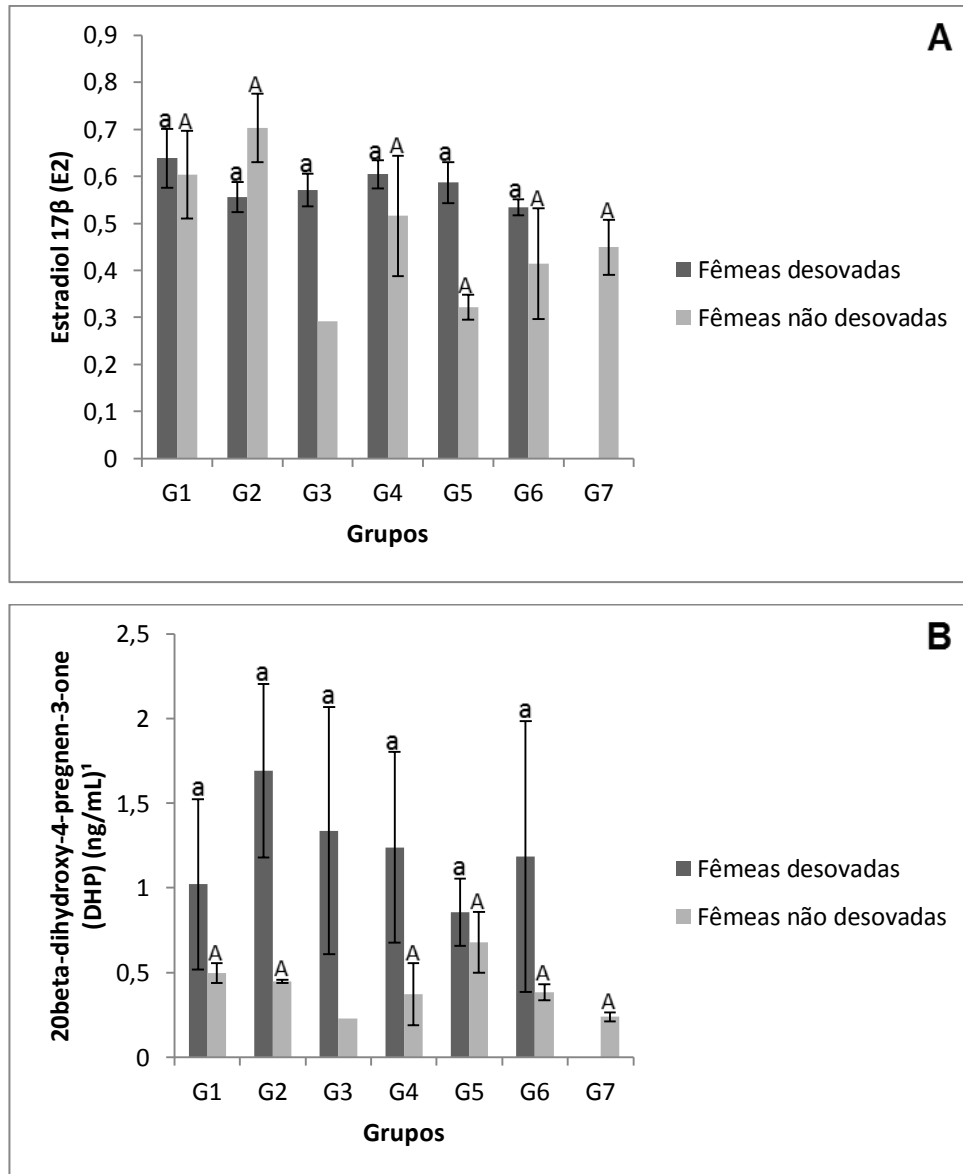


Figura 6. Níveis plasmáticos de E2 (ng /mL) (A) e DHP (ng/mL) (B), em *A. altiparanae* utilizando a densidade de 12 animais e diferentes proporções sexuais (Macho:Fêmea): G1 (1M:1F), G2 (2M: 1F), G3 (3M: 1F), G4 (1M: 2F), G5 (1M: 3F), no controle 1 G6 (12F) (100% fêmeas) as fêmeas foram injetadas com EHC, já no controle 2 G7 (12F) as fêmeas não foram injetadas com EHC. Os valores estão expressos na forma de média. Barras representam o erro padrão. Letras minúsculas indicam comparação entre os grupos das fêmeas desovadas (a), letras maiúsculas indicam comparação entre os grupos das fêmeas não desovadas (A), letras iguais indicam semelhança entre os grupos ($P < 0,05$). Teste One Way ANOVA.

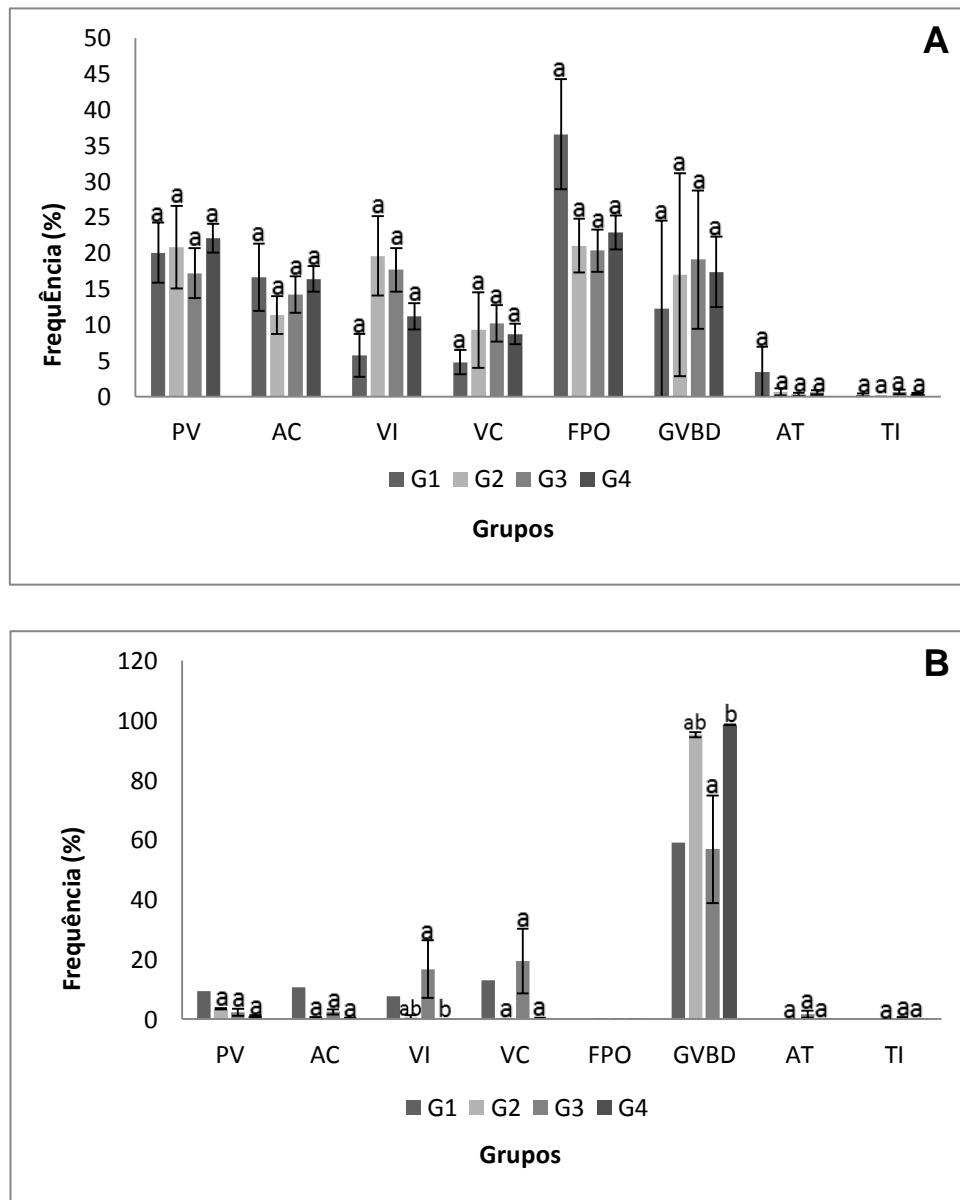


Figura 7. Frequência dos diferentes estágios de maturação dos oócitos (%), entre as fêmeas desovadas (A) e fêmeas não desovadas (B) de *A. altiparanae*, utilizando diferentes densidades de estocagem : G1: 3 (2M e 1F), G2: 6 (4M e 2F), G3: 12 (8M e 4F) e G4: 24 (16M e 8F) indivíduos. As estruturas foram classificadas da seguinte forma: Oócito pré-vitelogênico (PV); Oócito alvéolo cortical (AC), Oócito vitelogênico incompleto (VI); Oócito vitelogênico completo (VC); Folículo pós-ovulatório (FPO); Óócito com quebra da vesícula germinativa (GVBD); Tecido intersticial (TI); Oócito atrésico (AT). Os valores estão expressos na forma de média. Barras representam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Teste One Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

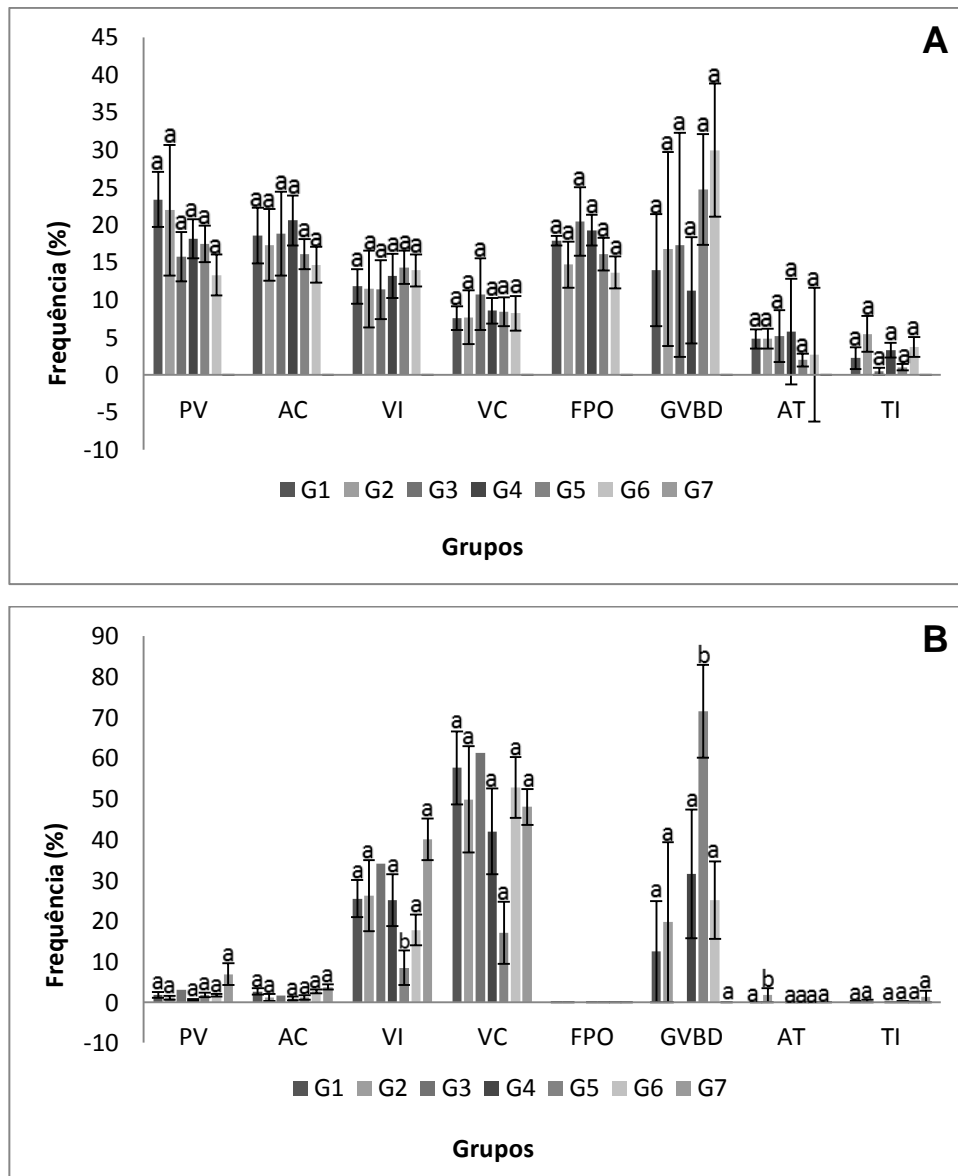


Figura 8. Frequência dos diferentes estágios de maturação dos oócitos (%), entre as fêmeas desovadas (A) e fêmeas não desovadas (B) de *A. altiparanae*, utilizando a densidade de 12 animais e diferentes proporções sexuais (Macho:Fêmea): G1 (1M:1F), G2 (2M:1F), G3 (3M:1F), G4 (1M:2F), G5 (1M:3F), no controle 1 G6 (12F) (100% fêmeas) as fêmeas foram injetadas com EHC, já no controle 2 G7 (12F) as fêmeas não foram injetadas com EHC. As estruturas foram classificadas da seguinte forma: Oócito pré-vitelogênico (PV); Oócito alvéolo cortical (AC), Oócito vitelogênico incompleto (VI); Oócito vitelogênico completo (VC); Folículo pós-ovulatório (FPO); Oócito com quebra da vesícula germinativa (GVBD); Tecido intersticial (TI); Oócito atresico (AT). Os valores estão expressos na forma de média. Barras representam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Teste One Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

4. DISCUSSÃO

Observamos em nosso trabalho desempenhos reprodutivos proporcionalmente similares com as densidades variando de 3 a 24 animais por tratamento. Estes dados indicam que um desempenho máximo (número total de embriões por unidade) pode ser obtido na densidade de 24 animais por unidade, fato confirmado pelo volume médio de desova e número médio de embriões viáveis estatisticamente superiores. Estas observações são respaldadas também pelos parâmetros similares obtidos para os esteroides gonadais e principalmente para as taxas de sobrevivência dos reprodutores.

Analisando os dados conjuntamente, notou-se que o adensamento maior provocado pelas maiores densidades não interferiu no desempenho reprodutivo, tal fato nos mostra que a densidade não foi um fator limitante na obtenção de um maior volume de desova e também na viabilidade destes ovos, pois obtivemos altas taxas tanto de fertilidade quanto de eclosão. Dados que estão de acordo com Kvarnemo (1995) no qual demonstrou que a densidade não afetou significativamente o nível de comportamento intra ou inter-sexual e sucesso reprodutivo na espécie (*Pomatoschistus minutus*) e Buchet (2008) que testando diferentes densidades em unidades experimentais com volumes distintos, demonstrou que o robalo apresentou bom desempenho reprodutivo em unidades com maior e menor volume. No entanto Fitzgerald e Keenleyside (1977) testando diferentes densidades na espécie (*Cichlasoma nigrofasciatum*) observou que o sucesso reprodutivo, declinou claramente à medida que a densidade aumentava.

Algumas densidades de estocagem já foram utilizadas na reprodução do lambari-do-rabo-amarelo em laboratório (Sato et al., 2006; Lira et al., 2018; Brambila-Souza et al., 2019), no entanto a densidade de estocagem foi definida para cada trabalho sem ser uma variável ou uma hipótese a ser testada, o que não nos proporciona muitos parâmetros para comparação. Ariki et al., (2017) em condições que mais se assemelham com nosso trabalho, mesma dosagem de EHC (6 mg kg^{-1}) nas fêmeas, mesmas unidades experimentais ($40 \times 28 \times 14 \text{ cm}$), sistema de recirculação com controle de temperatura e parâmetros de água, obteve um número médio de embriões viáveis de até $22344,0 \pm 19972,0$ utilizando o número de 15 animais por unidade experimental. No grupo G4 utilizando um adensamento maior de animais (24), obtivemos um número médio de embriões viáveis por réplica de

73819,2±20462,1, o que nos mostra que mesmo mais adensados, conseguimos obter um número de embriões viáveis 30% superior, e consequentemente maior produtividade. Sato et al., (2006) obtiveram taxas de desova de 72% e taxa de fertilização de 75,3±4,9% utilizando 65 animais em unidades de (80 x 40 x 70 cm), enquanto Lira et al., (2018) utilizaram 26 animais em unidades de (91 x 25 x 10 cm) e obtiveram taxas de fertilização de 46,76±15,95 e taxa de eclosão 47,67 ± 19,07. Em nosso trabalho obtivemos 86,51±0,98 de taxa de fertilidade e 81,05±10,81 de eclosão, utilizando uma densidade menor que aquela aplicada por estes autores. Na maior densidade que utilizamos (24 animais) também obtivemos taxas numericamente superiores àquelas apresentadas nos trabalhos supracitados, indicando que possivelmente a variação nas taxas entre os trabalhos ocorreu por outras variáveis, tais como a origem dos peixes, características genéticas do plantel, manejo dos peixes ao longo do ano, manejo de reprodutores, temperatura e muitas outras. Este fato é suportado pelos valores muito similares de fertilidade e eclosão obtidos no presente estudo em diferentes densidades, indicando que aparentemente, neste estudo, a densidade de estocagem não interferiu diretamente na sobrevivência dos embriões. Vale ressaltar que em ambos trabalhos supracitados, os animais também foram mantidos em sistema de recirculação fechado, temperatura e parâmetros de água controlados, e a mesma dosagem de EHC (6 mg kg⁻¹) foi empregada que em nosso trabalho.

Fitzgerald e Keenleyside (1977) avaliando o efeito das diferentes densidades na reprodução da espécie (*Cichlasoma nigrofasciatum*) em unidades experimentais com tamanhos diferentes, observou comportamentos agressivos e mortes nas unidades variando desde as maiores até as menores, no entanto os comportamentos agressivos seguidos de mortes eram intensificados nas unidades experimentais com tamanhos inferiores. Em nosso trabalho testando as diferentes densidades, notamos somente uma mortalidade em uma unidade com maior densidade (24) animais, esses dados nos mostram que as diferentes densidades não interferiram no bem estar animal desta espécie, que causariam um possível aumento nos comportamentos agressivos, estresse e ocasionalmente maior mortalidade dos reprodutores.

Analisando as diferentes proporções sexuais testadas em nosso trabalho, observamos desempenhos reprodutivos estatisticamente semelhantes. A proporção sexual pode variar de espécie para espécie, sendo o mais esperado a proporção de

1M:1F, podendo este fator ser influenciado por algumas variáveis, tais como o comportamento reprodutivo, disponibilidade de alimento, condições ambientais (NIKOLSKY, 1963; VENDEPUTTE, 2012) e também a densidade de estocagem que é diretamente correlacionada com a proporção sexual e, em última análise, tem influencia nas táticas de acasalamento que podem atrapalhar a reprodução (JIROTKUL, 1999b; DE JONG et al., 2009; WEIR, 2013). Outra variável na qual pode influenciar a proporção sexual é a razão sexual operacional (RSO, a razão de machos sexualmente ativos para fêmeas fertilizáveis) que é considerada um determinante importante da intensidade da seleção sexual (EMLEN; ORING, 1977).

A maior taxa de sobrevivência dos reprodutores foi observada quando as fêmeas eram em maior número $97,22 \pm 4,81\%$ (G5), já as menores taxas de sobrevivência foram notadas nos grupos onde os machos eram em maior número (G2) $91,67 \pm 14,43\%$ e (G3) $91,67 \pm 8,34$ dados que podemos explicar pelo fato dos machos serem frequentemente o sexo mais competidor (CLUTTON-BROCK; PARKER, 1992). Fatos que também estão de acordo com Kvarnemo (1995) no qual demonstrou que os machos da espécie (*Pomatoschistus minutus*) apresentam comportamentos reprodutivos mais agressivos quando comparados às fêmeas, como brigas e perseguir uns aos outros. De então atribuímos a essa maior mortalidade por brigas tanto na hora do cortejo como no momento do pareamento reprodutivo. Ainda neste contexto, um maior número de machos pode levar além de uma maior competição, a também um aumento tanto nos níveis de agressividade como estresse (JIROTKUL, 1999; RUHL et al. 2009), o que pode causar uma diminuição no sucesso da fertilização (SPENCE; SMITH, 2005; CLARK; GRANT, 2010), dados corroborados com nosso trabalho no qual o grupo (G2) obteve a menor taxa de fertilização $69,33 \pm 29,96\%$. O outro grupo no qual apresentou menor taxa de sobrevivência dos reprodutores com $91,67 \pm 8,34\%$ foi o grupo (G7), no qual predominava somente fêmeas que não foram injetadas, sendo assim, não estavam teoricamente em processo de desova, no entanto questões ligadas a territorialismo podem ter influenciado o número de fêmeas mortas, ou razões de sexo distorcidas que também podem levar a uma maior competição entre os membros do sexo mais abundante (CLUTTON-BROCK; VICENT, 1991).

Um maior volume de desova foi observado quando as fêmeas estavam em maior número (G4) e (G5) 206,00, 214,00ml respectivamente. Aliado a isso, esses grupos apresentaram taxas tanto de fertilidade como de eclosão consideradas

satisfatórias. Levando em consideração o volume de desova aliada as taxas de fertilidade e eclosão, um maior número de fêmeas apresentou um melhor desempenho quando comparados os grupos nos quais os machos eram em proporções superiores, estes fatos estão de acordo com Clutton-Brock e Parker (1992) que salientam que os machos geralmente têm uma taxa reprodutiva potencialmente mais alta que as fêmeas, o que pode nos explicar estas taxas superiores, pois um único macho pode fertilizar mais de uma fêmea. Ainda neste contexto observando os valores de volume de desova, um número maior de machos foi que apresentou numericamente os menores volumes obtidos, tendo em conta que os machos apresentam comportamentos agressivos mais que as fêmeas, a intensa competição não interfere apenas no aumento nos ataques violentos, mas também pode ocasionar inibição do acasalamento (KVARNEMO, ANHESJO, 1996).

Autores demonstraram o efeito das diferentes proporções sexuais em algumas espécies de peixes, tais como Lima (2018) testado o efeito da proporção sexual na espécie (*Araipamas gigas*) observou comportamentos agressivos na reprodução desta espécie quando a proporção de 1M:1F não era mantida, aliado a isso nesta espécie a proporção de 1M:1F foi a mais efetiva apresentando desovas em todas as réplicas. Maskill et al., (2017) testando a proporção sexual e a densidade de escotagem na espécie (*Plagopterus argentissimus*) obteve números semelhantes de ovos fertilizados médios / tratamento utilizando as proporções de 1M:1F e 3M:1F, já quando se utilizou a proporção de 5M:1F obteve um número de aproximadamente mais 50 embriões totais, já quando foi testada a proporção de 3M:1F com diferentes densidades, na densidade de 0,05 peixes/L não houve produção de embriões. Em nosso trabalho um número proporcionalmente maior de machos garantiu um melhor desempenho reprodutivo 3M:1F (G3), supomos que isso se deve às razões relacionadas à necessidade de maior quantidade de sêmen durante o pareamento para estimular as fêmeas a ovular nesta espécie. Fato respaldado pelos resultados de fecundidade relativa deste grupo que estatisticamente proporcionou a melhor relação peso / volume de ovos. Como a dose aplicada é baseada no peso do peixe, esses resultados indicam que essa proporção não apenas fornece o melhor resultado na obtenção de embriões viáveis (porque as taxas de fertilidade e eclodibilidade e número de embriões não variaram), mas também é a que forneceu a melhor relação quantidade hormônio utilizado / número de alevinos obtidos.

Observamos variações nos dois experimentos nos oócitos vitelogênicos incompletos (VI) e nos oócitos com quebra da vesícula germinativa (GVBD), quanto maior a frequência de (GVBD) menor era as de oócitos (VI), fato que podemos explicar pelo tamanho dos oócitos em GVBD serem proporcionalmente maiores que os oócitos (VI). No segundo experimento observamos também que o G2 apresentou um número maior de oócitos atrésicos, fato que assumimos ser normal, pois oócitos atrésicos são comumente encontrados nos ovários de teleósteos (NAGAHAMA, 1983).

De forma inédita relatamos que as fêmeas de (*Astyanax altiparanae*) injetadas com EHC apresentaram desova sem a presença de machos nas unidades experimentais. Supomos que questões comportamentais que desconhecemos ou feromônios sexuais podem estar ligados diretamente nestes achados, pois os níveis dos esteroides gonadais não variaram. De acordo com Gerlach (2006) as fêmeas dominantes da espécie (*Danio rerio*) usam feromônios para suprimir a reprodução em outras fêmeas. Segundo outros autores a exposição ao feromônio feminino não só melhora o comportamento de desova, mas também a produção de espermatozoides e a motilidade espermática dos machos (DEDRAPONT; SORENSEN, 1993). Podemos hipotetizar que os feromônios femininos podem ter estimulado o processo de desova nas fêmeas nas unidades pela ausência dos machos. Estudos ligados ao comportamento reprodutivo da espécie são sugeridos para um maior entendimento destes achados.

Informações sobre a proporção sexual na reprodução das diferentes espécies nativas são de extrema importância, tais informações são importantes não só em caráter científico no desenvolvimento de pesquisas e na produção aquícola, mas principalmente na construção de conhecimento sobre a biologia reprodutiva destas espécies em vida livre que poderam servir de auxílio para sua conservação. Há a necessidade de uma padronização nas unidades experimentais (volume, vazão, densidade, temperatura) e de variáveis a serem analisadas como (taxas de fertilidade, eclosão, fecundidade, sobrevivência e outras), bem como as fórmulas aplicadas que variam demasiadamente entre os trabalhos desenvolvidos com espécies nativas, dificultando a comparação entre os trabalhos e a construção do conhecimento.

Nas condições experimentais deste trabalho, a densidade de estocagem não influenciou negativamente no desempenho reprodutivo da espécie, e um número

maior de machos foi o que propiciou um melhor desempenho reprodutivo individual. Recomenda-se que a escolha da densidade deverá ser escolhida de acordo com a o número de embriões que se tenha interesse em produzir, e um maior número de embriões associado a um menor tempo e trabalho podem ser obtido utilizando a densidade de até 24 animais nas mesmas unidades aqui propostas. Aliada a uma maior produção de larvas e a utilização de uma menor dosagem hormonal, a proporção de 3M:1F é a mais indicada. Mais estudos são necessários acerca de aspectos comportamentais para um melhor entendimento dos efeitos tanto da densidade de estocagem como da proporção sexual nesta espécie.

5. REFERÊNCIAS

Abreu, M. R., Silva, L. M., Sato, R. T., Ariki, D. G. F., Kuradomi, R. Y., Batlouni, S. R. (2017). Uso de sGnRHa com e sem antagonista da dopamina na indução à desova de lambari, *Astyanax altiparanae*: Resultados preliminares, In: Reunião Científica do Instituto de Pesca (ReCIP), 12º, 2017 São Paulo, **Resumos expandidos da 12ª Reunião Científica do Instituto de Pesca**, São Paulo SP, Instituto de Pesca - APTA - SAA.

Andrade, L. S. de., Hayashi, C., Souza, S. R. de., Soares, C. M. (2004). Canibalismo entre larvas de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, cultivadas sob diferentes densidades de estocagem. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 26(3).

Archer, J. (1970). Effects of population density on rodents. In Social behavior of birds and mammals. Edited by Crook, J., H. **Academic Press**, New York. pp. 169-210.

Ariki, D. G., Freitas, G. A., Silva, L. M. J., Abreu, M. R., Sato, R. T., Calil, M. C., Silva Junior, A., Batlouni, S. R. (2017). Indução Hormonal: Efeitos de diferentes níveis de hipofiseação nos parâmetros reprodutivos de *Astyanax altiparanae*. In: Reunião Científica do Instituto de Pesca (ReCIP), 12º, 2017 São Paulo, **Resumos expandidos da 12ª Reunião Científica do Instituto de Pesca**, São Paulo SP, Instituto de Pesca - APTA - SAA.

Bertolini, R. M., Senhorini, J. A., Nascimento, N. F., Pereira-Santos, M., Nakaghi, L. S. O., Peres, W. A. M., Yasui, G. S. (2017). First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, 49(1), 68–74.

Bobe, J., Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, 165(3), 535–548.

Brambila-Souza, G., Mylonas, C. C., Mello, P. H., Kuradomi, R. Y., Batlouni, S. R., Tolussi, C. E., Moreira, R. G. (2019). Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. **General and Comparative Endocrinology**.

Brown, J., L. (1969). Territorial behavior and population regulation in birds. **Wilson Bull.** 81: 293-329.

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(4), 420–426.

Caneppele, D., Sanches, E. A., Romagosa, E. (2015). Sperm production of *Steidachneridion parahybae* (Steindachner 1877) and the effect of hormonal induction throughout one reproductive cycle. **Journal of Applied Ichthyology**, 31, 54–61.

Chaube, R., Singh, R. K., Joy, K. P. (2014). Effects of ovaprim, a commercial spawning inducer, on vasotocin and steroid hormone profiles in the catfish *Heteropneustes fossilis*: In vivo and in vitro studies. **General and Comparative Endocrinology**, 195, 190–200.

Clark L., Grant J, W, A. 2010. Intrasexual competition and courtship in female and male Japanese medaka, *Oryzias latipes*: effects of operational sex ratio and density. **Animal Behaviour**, 80:707–712.

Clutton-Brock, T., Parker, G. (1992). Potential Reproductive Rates and the Operation of Sexual Selection. **The Quarterly Review of Biology**, 67(4), 437-456.

Clutton-Brock, T. H., Vincent, A. C. J. (1991). Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. **Nature**, 351(6321), 58–60.

Criscuolo-Urbinati, E., Kuradomi, R. Y., Urbinati, E. C., Batlouni, S. R. (2012). The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Theriogenology**, 78(9), 2087–2094.

Defraipont, M., Sorensen, P. W. (1993). Exposure to the pheromone 17a, 20 β -dihydroxy-4-pregen-3-one enhances the behavioural spawning success, sperm production and sperm motility of male goldfish. **Animal Behaviour**, 46, 245-256.

De Jong K., Wacker, S., Amundsen, T., Forsgren E. 2009. Do operational sex ratio and density affect mating behavior? An experiment on the two-spotted goby. **Animal Behaviour**, 78:1229–1238.

De Souza, T. G., Hainfellner, P., Kuradomi, R. Y., Muñoz, M. E., Honji, R. M., Moreira, R. G., Batlouni, S. R. (2015). Inappropriate management conditions, especially for the regressed class, are related to sperm quality in *Prochilodus lineatus*. **Theriogenology**, 83(5), 797–807.

Dos Santos, M. P., Yasui, G. S., Xavier, P. L. P., Macedo Adamov, N. S., Nascimento, N. F., Fujimoto, T., Nakaghi, L. S. O. (2016). Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, 24(06), 795–807.

Drummond, C. D., Bazzoli, N., Rizzo, E., Sato, Y. (2000). Postovulatory follicle: A model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, 287(2), 176–182.

Dufour, S., Sebert, M.-E., Weltzien, F. A., Rousseau, K., Pasqualini, C. (2010). Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. **Journal of Fish Biology**, 76(1), 129–160.

Emlen, S., Oring, L. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. **Science**, 197(4300), 215–223.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture - 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma, Itália, 2014.

Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Roo, J., Hernández-Cruz, C. M., Izquierdo, M. (2013). Multiple GnRH injections to induce successful spawning of wild caught greater amberjack (*Seriola dumerilii*) matured in captivity. **Aquaculture Research**, 46(7), 1748–1759.

FitzGerald, G. J., Keenleyside, M. H. A. (1978). The effects of numerical density of adult fish on reproduction and parental behavior in the convict cichlid fish *Cichlasoma nigrofasciatum* (Günther). **Canadian Journal of Zoology**, 56(6), 1367–1371.

Garutti, V., Britski, H. A. (1997). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae), com mancha umeral horizontalmente ovalada, da bacia do rio Guaporé, Amazônia. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 40(14), 217-229.

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

Gomes, C. C., Costa, F. G., Borella, M. I. (2013). Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae*. **Micron**, 52-53, 33–38.

Genz, J., McDougall, C. A., Burnett, D., Arcinas, L., Khetoo, S., Anderson, W. G. (2014). Induced spawning of wild-caught adult lake sturgeon: assessment of hormonal and stress responses, gamete quality, and survival. **Journal of Applied Ichthyology**, 30(6), 1565–1577.

Gerlach, G. (2006). Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. **Animal Behaviour**, 72(5), 1119–1124.

Guerrero, H. Y., Cardillo, E., Poleo, G., Marcano, D. (2009). Reproductive biology of freshwater fishes from the Venezuelan floodplains. **Fish Physiology and Biochemistry**, 35(1), 189–196.

Godinho, H. (2007). Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção 1 Reproductive strategies

of fishes applied to aquaculture: bases for development of production technologies. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 31, 351-360.

Hainfellner, P., Souza, T. G. de, Moreira, R. G., Nakaghi, L. S. O., Batlouni, S. R. (2012). Gonadal steroids levels and vitellogenesis in the formation of oocytes in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, 10(3), 601–612.

Von Ihering, R., Azevedo. P. (1936), As piabas dos açudes nordestinos (Characidae: Tetragonopterinae). **Archivos do Instituto Biológico de São Paulo**. 7: 75-106 + 12 est..

Iltzés, I., Szabó, T., Kronbauer, E. C., & Urbányi, B. (2014). Ovulation induction in jundiá (*Rhamdia quelen*, Heptapteridae) using carp pituitary extract or salmon GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. **Aquaculture Research**, 46(12), 2924–2928.

Jirotkul M (1999) Population density influences male–male competition in guppies. **Animal Behavioral**, 58:1169–1175.

Kvarnemo, C., Forsgren, E., & Magnhagen, C. (1995). Effects of sex ratio on intra- and inter-sexual behaviour in sand gobies. **Animal Behaviour**, 50(6), 1455–1461.

Kvarnemo C., Ahnesjo I. (1996). The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. **Trends in Ecology and Evolution**, 11:404–408.

Kestemont, P., Jourdan, S., Houbart, M., Mélard, C., Paspatis, M., Fontaine, P., Baras, E. (2003). Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. **Aquaculture**, 227(1-4), 333–356.

Komen, H., Thorgaard, G. H. (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. **Aquaculture**, 269(1-4), 150–173.

Kupren, K., Kucharczyk, D., Prusińska, M., Krejszef, S., Targońska, K., Mamcarz, A. (2008). The Influence of Stocking Density On Survival and Growth of Buenos Aires Tetra (*Hemigrammus Caudovittatus*) Larvae Reared Under Controlled Conditions. **Polish Journal of Natural Science**. 23. 881-887.

Kuradomi, R. Y., De Souza, T. G., Foresti, F., Schulz, R. W., Bogerd, J., Moreira, R. G., Batlouni, S. R. (2015). Effects of re-stripping on the seminal characteristics of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the breeding season. **General and Comparative Endocrinology**, 225, 162–173.

Kuradomi, R. Y., Foresti, F., Batlouni, S. R. (2017). The effects of sGnRHa implants on *Piaractus mesopotamicus* female breeders. An approach addressed to aquaculture. **Aquaculture International**, 25(6), 2259–2273.

Levavi-Zermonsky, B., Yaron, Z. (1986). Changes in gonadotropin and ovarian steroids associated with oocytes maturation during spawning induction in the carp. **General and Comparative Endocrinology**, 62(1), 89–98.

Lima, A. F. (2018). The influence of sex ratio on the reproduction of pirarucu, *Arapaima gigas*, in captivity. **Acta Amazonica**, 48(1), 38-41.

Lira, L., V., Kuradomi, R., Y., de Souza, T., G., Hainfellner, P., Batlouni, S., R. (2018). *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. **Boletim Do Instituto De Pesca**, 44(4), 438-455.

Lister, A. L., Van Der Kraak, G. (2008). An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. **General and Comparative Endocrinology**, 159(1), 46–57.

Lopera-Barrero, N.M., Vargas, L., Sirol, R.N., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., & Mangolin, C.A.. (2010). Caracterização genética de *Brycon orbignyanus* utilizando o sistema seminatural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62(1), 184-191.

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, 165(3), 367–389.

Luz, R., K., Zaniboni Filho, E. (2002). Larvicultura do Mandi-amarelo *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) em Diferentes Densidades de Estocagem nos Primeiros Dias de Vida. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31(2), 560-565.

Maskill P. A. C., Miller, I. R., Halvorson, L. J., Treanor, H. B., Fraser, C. W., Webb, M. A. H. (2017). Role of sex ratio and density on fertilization success of intensively cultured endangered woundfin. **Journal of Fish and Wildlife Management** 8(1):249-254.

MPA (2013) Ministério da pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasília, DF. www.mpa.gov.br.

Murgas, L. D. S., Felizardo, V. O., Ferreira, M. R., Veras, G. C., Andrade, E. S., Paula, A. J. (2012). Eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Ciencia Animal**. 22. 197-206.

Mylonas, C. C., Fostier, A., Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, 165(3), 516–534.

Mylonas, C. C., Hinshaw, J. M., Sullivan, C. V. (1992). GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. **Aquaculture**, 106(3-4), 379–392.

Nagahama, Y. (1983). 6 The Functional Morphology of Teleost Gonads. Reproduction - **Endocrine Tissues and Hormones**, 223–275.

Nagahama, Y. Endocrine control of oocyte maturation. In Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles. Edited by Norris D., O., Jones, R., E. **Plenum Press, Nova York**, pp. 171-202, 1987.

Nagahama, Y., Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. Development, **Growth & Differentiation**, 50, S195–S219.

Nagata, M. M., Takahashi, L., Gimbo, R., Kojima, J. T., Biller-Takahashi, J. (2010). Influence of stock density in productive performance of freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Boletim do Instituto de Pesca**. 36. 9-16.

Nikolsky GV(1963) The ecology of fishes. **Academic Press**, London, UK, 352p

Ferreira do Nascimento, N., Siqueira-Silva, D. H., Pereira-Santos, M., Fujimoto, T., Senhorini, J. A., Nakaghi, L. S. O., Yasui, G. S. (2017). Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. **Zygote**, 25(04), 537–544.

Pereira, T. S. B., Boscolo, C. N. P., Moreira, R. G., Batlouni, S. R. (2016). The use of mGnRHa provokes ovulation but not viable embryos in *Leporinus macrocephalus*. **Aquaculture International**, 25(2), 515–529.

Podhorec, P., Socha, M., Ammar, I., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Brzuska, E., Milla, S., Gosiewski, G., Stejskal, V., Simko, M., Kouril, J. (2016). The effects of GnRHa with and without dopamine antagonist on reproductive hormone levels and ovum viability in tench *Tinca tinca*. **Aquaculture**, 465, 158-163.

Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Foresti, F., Castilho-Almeida, R. B. (2001) Cultivo do lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aqüicultura** 11, 15-19.

Porto-Foresti, F., Castilho-Almeida, R. B., Senhorini, J. A., Foresti, F. (2010). Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. (Eds.), **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. 2da edição, Editoraufsm, Santa Maria, RS, pp. 101- 115.

Rezende, F. P., Ribeiro Filho, O. P., Pereira, M. M., Takabatake, E. Y., Navarro, R. D., Santos, L. C. S., Silva, R. F., Camargo Filho, C. B. (2005) Eficiência de diferentes substratos na desova de lambari tambuí (*Astyanax bimaculatus*

LINNAEUS, 1758). **Revista Ceres**, 52 (302): 527-533.

Rosenfeld, H., Mylonas, C. C., Bridges, C. R., Heinisch, G., Corriero, A., Vassallo-Aguis, R., Zohar, Y. (2012). GnRH α -mediated stimulation of the reproductive endocrine axis in captive Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. **General and Comparative Endocrinology**, 175(1), 55–64.

Ruhl N., McRobert, S. P., Currie, W, J, S. (2009). Shoaling preferences and the effects of sex ratio on spawning and aggression in small laboratory populations of zebrafish (*Danio rerio*). **Lab Animal**, 38:264–269.

Sato, Yoshimi, Sampaio, Edson V., Fenerich-Verani, Nelsy, Verani, José R.. (2006). Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 23(1), 267-273.

Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, 165(3), 390–411.

Silva, L. M. J., Abreu, M. R., Freitas, G. A., Souza, G. B., Kuradomi, R. Y., Batlouni, S. R. Utilização do extrato bruto de hipófise do lambari *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Caharacidae) como indutor de desova.. In: XII Reunião Científica do Instituto de Pesca, 2017, São Paulo. XII Reunião Científica do Instituto de Pesca, 2017.

Soares, C. M., Hayashi, C., Meurer, F., Schamber, C. R.. (2002). Efeito da densidade de estocagem do quinguio, *Carassius auratus* L., 1758 (Osteichthyes, Cyprinidae), em suas fases iniciais de desenvolvimento. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. 24.

Spence R., Smith C. 2005. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. **Animal Behaviour**, 69:1317–1323.

Sussel, F. R. (2012). Fontes e níveis de proteína na alimentação do lambari-do-rabo-amarelo: desempenho prdutivo e análise econômica. Tese de Doutorado, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. doi:10.11606/T.74.2012.tde-18032013-133242. Recuperado em 2019-07-15, de www.teses.usp.br.

Sussel, F. R. Lambari: Pequeno no tamanho, grande no potencial. **Panorama da Aquicultura**. 25:50-53, 2015.

Szabó, T., Medgyasszay, C., Horváth, L. (2002). Ovulation induction in nase (*Chondrostoma nasus*, Cyprinidae) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. **Aquaculture**, 203(3-4), 389–395.

Thompson, R. L., Mead, C. M., Edwards, R. (2007). Effective Storm-Relative Helicity and Bulk Shear in Supercell Thunderstorm Environments. **Weather and Forecasting**, 22(1), 102–115.

Trudeau, V. L. (2006). Comparative neuroendocrinology: Integration of hormonal and environmental signals in vertebrates and invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 144(3), 243–246.

Tyler, C. R., Sumpter, J. P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. Reviews in **Fish Biology and Fisheries**, 6(3), 287–318.

Vandeputte M., Quillet E., Chatain, B. (2012) Are sex ratios in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) populations biased? **Aquat Living Resour**, 25: 77-81.

Verner, J. (1977). On the Adaptive Significance of Territoriality. **The American Naturalist**, 111(980), 769-775.

Viveiros, A. T. M., Gonçalves, A. C. S., Di Chiacchio, I. M., Nascimento, A. F., Romagosa, E., Leal, M. C. (2013). Gamete quality of streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) after GnRH α and dopamine antagonist treatment. **Zygote**, 23(02), 212–221.

Zanata, A. M. Estudo filogenético e revisão taxonômica das espécies de Tetragonopterinae com espinho pélvico (Characidae; Characiformes). **Master's Thesis**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

Zaniboni-Filho E, Nuñez A, P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C., Fracalossi, D. M, Castagnolli, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce. São Paulo, SP: **TecArt**, 2004. p.45-73.

Zaniboni Filho, E., Weingartner, M. (2007). Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 31. 367-373.

Zohar, Y., Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, 197(1-4), 99–136.

Watson, A., Moss, R. (1970). Dominance, spacing behaviour and aggression in relation to population limitation in vertebrates. *Animal Population in Relation to Their Food Resources*.

Weir, L. K. (2012). Male–male competition and alternative male mating tactics influence female behavior and fertility in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 67(2), 193–203.

Weber, A. A., Arantes, F. P., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N. (2012). Oocyte adhesiveness and embryonic development of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae). **Zygote**, 21(02), 198–202.

Wynne-Edwards, V., C. (1962). Animal dispersion in relation to social behaviour. **Canadian Medical Association journal**, 88(25):1255–1256.