

CLÁUDIA KELLY FERNANDES DA CRUZ

**ESTUDO DA GAMETOGÊNESE E MATURAÇÃO GONADAL DO PACAMÃ
Lophiosilurus alexandri EM CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Março de 2017

CLÁUDIA KELLY FERNANDES DA CRUZ

**Estudo da gametogênese e maturação gonadal do pacamã *Lophiosilurus alexandri*
em condições de cultivo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Elizete Rizzo

Co-orientador: Dr. Ronald Kennedy Luz

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Março de 2017

Dissertação apresentada em 24 de março de 2017.

Resultado:

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Enemir dos Santos
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas)

Prof. Dr. Rafael Magno Costa Melo
ICB/UFMG

Profa. Dra. Elizete Rizzo
ICB/UFMG (Orientadora)

Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz
Escola de Veterinária/ UFMG (Co-orientador)

Este trabalho foi realizado no laboratório de Ictiohistologia, localizado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, em parceria com o Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária, UFMG com o suporte financeiro das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico esse trabalho aos grandes amores da minha vida:

Meu querido Pai, Raimundo, dono de uma sabedoria imensurável;

Minha querida Mãe, Mirtes, personificação do amor;

Ao meu eterno companheiro, Phillipy.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A Deus eu devo tudo e a Ele agradeço por ter permitido a conclusão de mais uma etapa de grande importância em minha vida;

À minha orientadora Profa. Dra. Elizete Rizzo por toda a bagagem de conhecimento compartilhada durante esses anos, dedicação e exemplo de profissionalismo;

Ao meu co-orientador Ronald Kennedy Luz e seus alunos do Laboratório de Larvicultura do LAQUA, que tanto contribuíram para esse trabalho, especialmente ao Cristiano por toda a paciência e disposição para ajudar!

Aos meus amigos e colegas do Labictio, Ana Paula, Davidson, Guto, Luis, Alessandro, Lourenço, Yves, Camila, especialmente à Moniquinha, Rafael e André por toda a ajuda, disponibilidade e parceria no projeto. Agradeço a todos pela ótima convivência diária;

Aos meus queridos amigos do coração, Cristiane, Érika, Letícia, Ariadne, Hanaisa, Bruna, Carol, Augusto, pela amizade sincera e suporte emocional;

A todos os meus colegas, professores, secretaria e coordenação do PPGBioCel;

Aos técnicos Jamil Oliveira e Mirra Silva, Dra. Vany Ferraz e Profa. Dra. Jacqueline Takahasi;

Às famílias Ferreira e Vieira pelo carinho;

Aos meus pais que palavras não tenho para agradecer todo o apoio que sempre me deram;

Ao Phillipy, meu amado companheiro, pela paciência, dedicação, amor e inestimável ajuda.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Espécie estudada.....	2
1.2 Gametogênese e maturação gonadal.....	3
1.3 Regressão folicular	5
1.4 Parâmetros sanguíneos e estresse	6
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. METODOLOGIA.....	12
3.1 Amostragem dos peixes e índices biológicos	12
3.2 Hematologia e bioquímica sanguínea.....	15
3.3 Níveis hormonais	15
3.4 Análises histológicas e ultraestruturais	16
3.5 Morfometria.....	16
3.6 Fecundidade.....	17
3.7 Proteínas da zona radiata (Zrps) e vitelogenina (Vtg).....	17
3.8 Análise estatística	18
4. RESULTADOS	19
4.1 Indicadores biológicos dos peixes	19
4.2 Maturação gonadal e fecundidade	19
4.3 Morfometria.....	28
4.4 Ultraestrutura dos folículos vitelogênicos	30
4.5 Níveis hepáticos de vitelogenina (Vtg) e proteínas da zona radiata (Zrps).....	33
4.6 Concentrações séricas de esteroides sexuais	33
4.7 Parâmetros hematológicos e níveis séricos de cortisol.....	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

Poucas espécies de peixes nativos com potencial para a piscicultura possuem tecnologia de produção totalmente desenvolvida e consolidada para as diferentes fases do cultivo. O objetivo desse estudo foi analisar a gametogênese e maturação gonadal do pacamã, *Lophiosilurus alexandri* em condições de cultivo, relacionando os parâmetros reprodutivos com as condições fisiológicas dos peixes. Para isso, exemplares adultos (primeira geração filial de reprodutores selvagens) previamente acondicionados em tanque com 10.000 L de água a 23°C no Laboratório de Aquicultura da UFMG (LAQUA) foram transferidos para tanque circular com 3.000 L de água aquecida artificialmente à 27°C. A amostragem dos peixes foi realizada em quatro períodos: a primeira, antes do aquecimento da água (grupo T1, água a 23°C) e as três subsequentes com 20 e 40 (grupo T2) e 70 dias (grupo T3) após aquecimento da água a 27°C. Dois casais de *L. alexandri* foram colocados em tanque de fundo de areia com água aquecida à 27°C para verificar a formação de ninhos e ocorrência de desova. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados diariamente para garantir as condições ideais de cultivo. De cada exemplar foram obtidos os dados biométricos, os indicadores fisiológicos e parâmetros sanguíneos dos peixes. Amostras de gônadas e fígado foram coletadas para processamento histológico e imunoenensaio de ELISA. A frequência de fêmeas em maturação foi maior no T3, onde foram encontrados os melhores parâmetros reprodutivos: maior IGS, diâmetro dos folículos vitelogênicos e altura das células foliculares, que foram relacionados a elevadas concentrações séricas de 17 β -estradiol e níveis hepáticos de vitelogenina. Em contrapartida, no T1 houve alta frequência de fêmeas com ovários em regressão e alto índice de atresia folicular. A fecundidade absoluta no T3 variou de 5.449,364 a 12.581,74 ovócitos por fêmea. Os níveis séricos de 17 α -hidroxiprogesterona variaram discretamente entre os tempos de coleta, elevando-se do T2 para o T3, onde as fêmeas alcançaram a maturação final ovocitária. No entanto, não foram encontradas desovas no fundo dos tanques, sequer nos casais mantidos em tanque com fundo de areia. Os níveis séricos de 11-ketotestosterona em machos aumentaram consideravelmente após o aquecimento da água (T2 e T3), porém os parâmetros reprodutivos foram semelhantes nos três grupos de amostragem. A presença de machos intersexo (11%) e, níveis hepáticos de vitelogenina e proteínas da zona radiata semelhante aos das fêmeas, sem uma aparente desorganização da estrutura testicular e da função espermatogênica, alertam para a ocorrência de desregulação

endócrina nas condições do cultivo. Diferenças significativas em relação às variáveis hematológicas e bioquímicas foram observadas com o aumento da temperatura (T2 e T3), havendo aumento da glicose sanguínea e número de eritrócitos tanto em fêmeas quanto em machos. Apesar das concentrações séricas de cortisol não diferirem entre os tempos de coleta em machos, em fêmeas houve diferenças significativas entre os tempos T2 e T3. Em conjunto, os resultados indicam que o aumento da temperatura da água estimula a gametogênese e maturação gonadal de *L. alexandri* em condições de cultivo, sendo as fêmeas mais sensíveis do que os machos às mudanças de temperatura. Manutenção dos peixes em baixas temperaturas da água (23°C) induz atresia folicular em ovários, que pode reduzir o potencial reprodutivo da espécie em cativeiro. Os parâmetros sanguíneos analisados apresentaram variações fisiológicas e podem ser utilizados como indicadores de saúde de *L. alexandri* mantidos em cativeiro.

Palavras-chave: Reprodução, esteroides sexuais, gametogênese, atresia folicular, intersexo, hematologia, bioquímica sanguínea.

ABSTRACT

Few native fish species with potential for fish farming have fully developed and consolidated production technology for the different stages of cultivation. The aim of this study was to analyze the gametogenesis and gonadal maturation of the pacamã, *Lophiosilurus alexandri* under culture conditions, relating the reproductive parameters with the physiological conditions of the fish. For this, adult specimens (first filial generation of wild breeding) previously kept in a tank with 10,000 L of water at 23°C in the Aquaculture Laboratory of the UFMG (LAQUA) were transferred to circular tank with 3,000 L of artificially heated water at 27°C. Fish sampling was performed in four periods: the first, before water heating (T1 group, water at 23°C) and the subsequent three periods at 20 and 40 (T2 group) and 70 (T3 group) days after heating water at 27°C. Two couples were placed in a sand-bottom tank with water heated at 27°C in order to verify the nest formation and spawning occurrence. The physico-chemical parameters of the water were monitored daily to ensure optimum conditions of cultivation. Biometric data, physiological indicators and blood parameters of the fish were obtained from each specimen. Samples of gonads and liver were collected for histological processing and ELISA. The frequency of maturing females was higher in T3, where the best reproductive parameters were found: higher IGS, vitellogenic follicle diameter and follicular cell height, which were associated with the higher serum concentrations of 17 β -estradiol and hepatic levels of vitellogenin. On the other hand, there was a high frequency of females with regressing ovaries in T1 and a high index of follicular atresia in ovaries. The absolute fecundity in T3 varied from 5,449.364 to 12,581.74 oocytes per female. Serum levels of 17 α -hydroxyprogesterone varied discretely between collection times, rising from T2 to T3, where females reached final oocyte maturation. However, no spawning was found in the bottom of the tank, even when couples were placed in sand-bottom tank. In males, serum levels of 11-ketotestosterone increased considerably after water heating (T2 and T3), but reproductive parameters were similar in all three sampling groups. The presence of intersex males (11%) and levels of vitellogenin and proteins of the zona radiata similar to that of the females, without an apparent disorganization of the testicular structure and spermatogenesis, is a concern regarding the occurrence of endocrine dysregulation in captive conditions. Significant differences in the hematological and biochemical variables were observed in T2 and T3, with increased blood glucose and number of

erythrocytes in both male and female fish. Although seric concentrations of cortisol did not differ amongst collection times in males, significant differences were observed in females between times T2 and T3. Together, the results indicate that the increase in water temperature stimulates the gametogenesis and gonadal maturation of *L. alexandri* under culture conditions, with females being more sensitive than males to changes of the temperature. Maintenance of fish at low water temperatures (23°C) induces follicular atresia in ovaries, which may reduce the reproductive potential of the species in captivity. The blood parameters presented physiological variations, which can be used as health indicators for *L. alexandri* kept in captivity.

Key-words: Reproduction, sex steroids, gametogenesis, follicular atresia, intersex, hematology, blood biochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS

10L:14E = 10h luz: 14h escuro

11-KT = 11-ketotestosterona

17 α -OHP = 17 α -hidroxiprogesterona

17 β -E = 17 β -estradiol

AB = Alcian Blue

ACTH = corticotropina

BSA = albumina sérica bovina

C1 = espermátócito primário

C2 = espermátócito secundário

CA = corpo amarelo

CAs = catecolaminas

Cd = caudal

Ceraqua-SF = Centro de Referência em Aquicultura e Recursos Pesqueiros do São Francisco

CEUA = Comitê de Ética e Uso de Animais da UFMG

CF = célula folicular

Chesf = Companhia Hidro Elétrica do São Francisco

COBEA = Colégio brasileiro de experimentação animal

Codevasf = Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba

Conama = Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cr = cranial

CRH = hormônio liberador de corticotrofina

CT = comprimento total

DHP = 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-one

DP = desvio padrão

E = espermátide

ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EP = erro padrão

EPPA = Estação de Piscicultura de Paulo Afonso

FA = folículo atrésico

FL = fecundidade absoluta em lotes

FAO = Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FSH = hormônio folículo estimulante
FPO = folículo pós-ovulatório
FV = folículo vitelogênico
G = espermatogônia
GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina
GV = glóbulo de vitelo
HE = hematoxilina e eosina
HHG = eixo hipotálamo-hipófise-gônada
HHI = eixo hipotálamo-hipófise-interrenal
IGS = índice gonadossomático
IHS = índice hepatossomático
IRE = índice de repleção estomacal
K = fator de condição de Fulton
kDa = kilodalton
L = lume
LAQUA = Laboratório de Aquacultura da UFMG
LH = hormônio luteinizante
LV = liquefação do vitelo
MB = membrana basal
MPA = Ministério da Pesca e Aquicultura
N = núcleo
NO = número de ovócitos vitelogênicos na amostra
OPD = o-fenilenodiaminadihidroclorato
Ov = ovócitos
PA = peso da amostra
PAS = ácido periódico de schiff
PC = peso corporal
PE = peso do estômago
PF = peso do fígado
PG = peso da gônada
PN = folículo perinucleolar
PN1 = folículo perinucleolar inicial
PN2 = folículo perinucleolar avançado
PPT = proteína plasmática total

PV = folículo pré-vitelogênico

VC = vesícula cortical

T1 = tempo 1

T2 = tempo 2

T3 = tempo 3

T = testosterona

Tc = teca

TS = túbulo seminífero

Vtg = vitelogenina

Z = espermatozoides

ZRI = zona radiata interna

ZRE = zona radiata externa

Zrp = proteínas da zona radiata

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variáveis e índices biológicos de fêmeas e machos de *L. alexandri* sob condições de cultivo.....**21**
- Tabela 2.** Proporção (%) das estruturas ovarianas, diâmetro dos folículos vitelogênicos, altura das células foliculares e índice de atresia folicular de fêmeas de *L. alexandri* sob condições de cultivo.....**29**
- Tabela 3.** Proporção (%) das células da linhagem espermatogênica de machos de *L. alexandri* sob condições de cultivo.....**29**
- Tabela 4.** Variáveis hematológicas, bioquímica sanguínea e níveis séricos de cortisol em fêmeas de *L. alexandri* sob condições de cultivo.....**37**
- Tabela 5.** Variáveis hematológicas, bioquímica sanguínea e níveis séricos de cortisol em machos de *L. alexandri* sob condições de cultivo.....**37**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar de pacamã, *L. alexandri*. Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 4 cm..... 2
- Figura 2.** Tanques utilizados para acondicionamento dos exemplares de *L. alexandri* do presente estudo. A) Tanque 1: tanque retangular com capacidade de 10.000 L. B) Tanque 2: tanque circular com capacidade de 3.000 L. Fonte: arquivo pessoal.....14
- Figura 3.** Curvas de diluição dos ensaios de ELISA de A) vitelogenina (Vtg) e B) proteínas da zona radiata (Zrps) hepáticas de *L. alexandri*.....18
- Figura 4.** Características macroscópicas de testículos (A) e ovários (B) maduros de pacamã, *L. alexandri* sob condições de cultivo. Cr: região cranial; Cd: região caudal; Fr: franjas; Ov: ovócitos. Fonte: arquivo pessoal. Barras de escala = 1 cm.....22
- Figura 5.** Frequência relativa (%) dos estádios de maturação gonadal de fêmeas de *L. alexandri*. Amostragem dos peixes: (T1) dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; (T2) 20 a 40 dias em água aquecida a 27°C e (T3) 70 dias em água aquecida a 27°C.....22
- Figura 6.** Secções histológicas de ovários de *L. alexandri* mostrando estruturas ovarianas.....24
- Figura 7.** Secções histológicas de ovários atrésicos de *L. alexandri*.....25
- Figura 8.** Secções histológicas de testículos de *L. alexandri*.....27
- Figura 9.** Ultraestrutura de folículos vitelogênicos de *L. alexandri*.....32

Figura 10. Variações do índice gonadossomático (IGS) de fêmeas (A) e machos (B), níveis hepáticos de vitelogenina (Vtg) em fêmeas (C) e machos (D) e proteínas da zona radiata (Zrps) em fêmeas (E) e machos (F) de *L. alexandri* nos três tempos de coleta. T1 = dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; T2 = 20 a 40 dias em água aquecida a 27°C; T3 = 70 dias em água aquecida a 27°C. Valores expressos como média ± EP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta, $p < 0,05$**34**

Figura 11. Concentrações séricas de 17 β -estradiol (A) e 17 α -hidroxiprogesterona (B) em fêmeas e 11-ketotestosterona (C) em machos de *L. alexandri*. T1 = dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; T2 = 20 a 40 dias em água aquecida a 27°C; T3 = 70 dias em água aquecida a 27°C. Valores expressos como média ± EP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta, $p < 0,05$**35**

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade agropecuária relacionada ao cultivo de organismos cujo ciclo de vida se dá total ou parcialmente em meio aquático (Brasil, 2017). De acordo com um levantamento de 2011, disponibilizado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a produção aquícola nacional nesse ano foi de aproximadamente 630 mil toneladas, com um incremento de 51,2% na produção entre os anos de 2009 e 2011, o que evidencia o crescimento do setor no país. A piscicultura de água doce destaca-se como uma das atividades agropecuárias que mais cresceu recentemente no Brasil, representando cerca de 87% da produção total nacional em 2011 (Brasil, 2013). Estes dados ilustram o promissor potencial do Brasil em atender à crescente demanda mundial, e com os constantes investimentos no setor, pode ser responsável pelo maior aumento na produção de pescado da América Latina na próxima década, cerca 104% até 2025, segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2016).

Nesse contexto, a piscicultura brasileira poderá ocupar um papel de destaque no cenário mundial, uma vez que a pesca extrativista está comprometida em função da redução dos estoques de pescado causada pela extração excessiva e alterações das condições ambientais para a reprodução e desenvolvimento inicial dos peixes. Tais alterações são ocasionadas por intervenções antrópicas que têm levado ao desaparecimento de espécies de peixes de importância econômica e ecológica, com consequente redução da oferta de alimento (Ostrenskyet al., 2007). Embora a aquicultura seja uma atividade considerada de baixo impacto ambiental pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), alguns pontos merecem atenção, como a utilização de espécies de peixes exóticas ou alóctones que podem causar impactos sobre a biota. Segundo dados da FAO (2007), a aquicultura de água interiores tem sido a grande responsável pela introdução de espécies exóticas e pela transferência de espécies entre bacias hidrográficas. Registros de introdução de espécies em diferentes países mostram que a aquicultura contribuiu com 38,7% dessa introdução (Ostrenskyet al., 2007). Existem cerca de 40 espécies de peixes de água doce com potencial para a piscicultura no Brasil, no entanto, a tilápia, espécie de peixe originária da África, atualmente é a mais criada em cativeiro no Brasil, representando em 2011, 46,6% da produção nacional, e uma das mais criadas no mundo (Brasil, 2013; Kubitza 2013). O

principal estímulo para a produção de tilápia e outras espécies exóticas, está mais relacionado à existência de uma cadeia produtiva estruturada e ao vasto desenvolvimento tecnológico do que propriamente às características das espécies (Andrade & Yasui, 2003). Apesar da riqueza em recursos hídricos e da biodiversidade nacional, poucas espécies nativas com grande potencial produtivo possuem tecnologia de produção totalmente desenvolvida e consolidada para as diferentes fases de cultivo.

1.1 Espécie estudada

A espécie *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876) pertence à ordem Siluriformes e a família Pseudopimelodidae (Fig. 1). Conhecida popularmente como pacamã, pacamão ou niquim (Britski, 1986), endêmica do rio São Francisco, é espécie sedentária, tendo preferência por ambientes lênticos. Bentônica e carnívora de hábitos noturnos, o pacamã camufla-se na areia durante o dia e à noite caça suas presas através de emboscada (Tenório, 2003; Tenório et al., 2006). Na natureza, seu período reprodutivo estende-se de outubro a fevereiro, com múltiplas desovas que são depositadas em ninhos construídos em substrato arenoso (Sato et al., 2003c; Barros et al., 2007). Apresenta cuidado parental por parte do macho que se mantém apoiado sobre o ninho (Sato et al., 2003c; Ávila, 2006; Tenório et al., 2006). Seus ovos são adesivos, demersais, com altos valores de diâmetro e apresenta baixa fecundidade (Rizzo et al., 2002; Sato et al., 2003b; Sato et al., 2003c; Shibatta, 2003).



Figura 1. Exemplar de pacamã, *L. alexandri*.

Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 4 cm.

Em relação à morfologia externa, apresenta cabeça e corpo muito achatados, olhos muito pequenos, mandíbula prognata com os dentes expostos quando a boca encontra-se fechada (Britski et al., 1986). Em geral, fêmeas são maiores que os machos, apresentando uma coloração castanha, com pontuações castanho-escuras sobre o dorso e nos flancos, enquanto os machos são de porte menor e apresentam uma coloração castanho-amarelada quase sem pontuações, entretanto esse dimorfismo sexual nem sempre é evidente (Tenório, 2003; Luz et al., 2011; Lopes, 2013). O pacamã pode atingir 70 cm de comprimento total e 8 kg de peso corporal e tecnologia para a desova induzida por hipofiseação foi desenvolvida com sucesso, e mais de 80% das fêmeas responderam positivamente a indução hormonal (Santos et al., 2013), entretanto tecnologias de produção em cativeiro são ainda incipientes.

1.2 Gametogênese e maturação gonadal

O ciclo reprodutivo de peixes envolve duas fases, a gametogênese (espermatogênese e vitelogenese) e a maturação (espermição e maturação dos ovócitos), ambas controladas por uma cascata de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) (Mylonas et al., 2010). Fatores abióticos podem interferir na biologia da reprodução, desencadeando a maturação gonadal. Esses estímulos são captados pelos órgãos dos sentidos, convertidos em sinais eletroquímicos no cérebro e transmitidos ao hipotálamo, estimulando a produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Este, por sua vez, induz a hipófise a liberar as gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), que estimulam a produção de esteroides sexuais gonadais, regulando e desencadeando o desenvolvimento e maturação dos gametas (Nagahama, 1994; Kumakura et al., 2003). Os perfis de esteroides sexuais são parâmetros importantes para a piscicultura, tendo sido abordados em algumas espécies de peixes neotropicais em condições de cultivo (Gazola & Borella, 1997; Barcellos et al., 2001, 2002; Arantes et al., 2010, 2011). Conhecimento do controle da gametogênese é importante na manipulação da reprodução, uma vez que os hormônios do eixo HHG e seus análogos são geralmente utilizados para induzir a reprodução de peixes em cativeiro (Mylonas et al., 2010).

Nos machos, a gametogênese é dividida em três fases distintas: 1) fase mitótica ou espermatogonial, que é caracterizada pela proliferação e auto-renovação das espermatogônias; 2) fase meiótica com espermatócitos primários e secundários e, 3) fase espermiogênica, onde espermatídes originam espermatozoides, que são posteriormente liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (Schulz et al., 2010). O FSH induz a célula de Leydig a transformar o colesterol em pregnenolona, que posteriormente será convertida em testosterona (T) e 11-ketotestosterona (11-KT), o principal andrógeno em teleósteos. A T, e em especial a 11-KT, são responsáveis pela maturação testicular, atuando na divisão das espermatogônias, formação de cistos de espermatócitos e início da liberação de espermatozoides no lume dos túbulos seminíferos (Schulz et al., 2010). O FSH também estimula a conversão de T através da enzima P450-aromatase em 17- β -estradiol (17 β -E), responsável pela proliferação e auto-renovação de espermatogônias e pela diferenciação das células germinativas (Schulz & Miura, 2002; Miura et al., 2006), além de induzir a proliferação de células de Sertoli em testículos espermiados (Chaves-Pozo et al., 2007). Durante a maturação das células germinativas, altos níveis de T e 17 β -E inibem a liberação do FSH pela hipófise. O LH, mais ativo nas fases mais tardias da espermatogênese, estimula as células de Leydig a produzirem 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP), a qual é convertida em 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-one (DHP), responsável pela diferenciação e maturação dos espermatozoides (Yamada et al., 2002).

Nas fêmeas, as ovogônias dividem por mitose, diferenciam em ovócitos e estes entram em meiose. O desenvolvimento do folículo ovariano pode ser dividido em dois estágios principais, o crescimento primário independente de gonadotrofinas e o crescimento secundário dependente de gonadotrofina (Tyler & Sumpter, 1996; Patiño & Sullivan, 2002). O crescimento primário abrange os estágios cromatina-nucléolo e perinucleolar e está intimamente ligado ao desenvolvimento das camadas de células foliculares em torno do ovócito. As vesículas corticais são sintetizadas anteriormente ou concomitante ao início da endocitose de lipídeos e vitelogenina (Lubzens et al., 2010). À medida que o ovócito cresce, as vesículas corticais aumentam em número e tamanho, enchendo o citoplasma e, eventualmente são deslocadas para a periferia durante os estágios finais de desenvolvimento, devido ao acúmulo centrípeto de proteínas vitelogênicas (Lubzens et al., 2010). Na fase vitelogênica ou de crescimento secundário, o FSH estimula as células da teca a sintetizarem T a partir de colesterol, que é

transportada para a granulosa e convertida em 17β -E (Mylonas et al., 2010). No fígado, 17β -E induz a síntese de vitelogenina (Vtg), uma glicofosfolipoproteína de alto peso molecular (250-600 kDa), e proteínas da zona radiata (Zrps) que formam o envelope acelular do ovócito. Estas proteínas são captadas pelos folículos ovarianos em crescimento por endocitose mediada por receptores específicos (Wootton & Smith, 2015). A queda do FSH é acompanhada pelo aumento do LH, que induz a produção de 17α -OHP pelas células da teca, sendo posteriormente convertido no hormônio indutor da maturação final, DHP, que vai então promover a maturação ovocitária final, caracterizada pela migração da vesícula germinativa em direção à micrópila (Nagahama, 1994; Nagahama & Yamashita, 2008).

A vitelogênese é um processo chave para o sucesso da reprodução e produção de proles saudáveis na aquicultura. Ovócitos vitelogênicos apresentam lipídeos e proteínas vitelínicas que proverão energia para o embrião durante a embriogênese e a larva por algum tempo após a eclosão (Murzina, 2012). As Zrps que formam o envelope acelular dos ovócitos possuem muitas funções diferentes, tais como absorção de nutrientes, proteção do ovócito em crescimento até o momento da eclosão, ligação espécie-específica do espermatozoide, orientação do esperma até a micrópila e propriedades bactericidas (Modig et al., 2007). A Vtg e as Zrps são normalmente encontradas no sangue de fêmeas, enquanto nos machos os níveis plasmáticos dessas proteínas são muito baixos ou inexistentes. Porém, a síntese e secreção de Vtg e Zrps podem ser induzidas em fígados de peixes machos expostos a estrógenos ambientais (Kime et al., 1999; Prado et al., 2011; Prado et al., 2014; Weber et al., 2017). Apesar de existirem dados em condições de impacto ambiental, informações sobre níveis de Vtg e Zrps em peixes nativos são incipientes e não foram relatados para o pacamã.

1.3 Regressão folicular

Após a desova, ovários de peixes apresentam folículos perinucleolares, vitelogênicos em processo de atresia e folículos pós-ovulatórios (FPOs). Essas estruturas envolvem progressivamente durante a regressão ovariana para que se inicie um novo ciclo reprodutivo, retornando à fase de repouso. Os FPOs são remanescentes dos folículos vitelogênicos ovulados, constituídos por células foliculares e célula micropilar, apoiadas em uma membrana basal e teca conjuntiva circundando o lume

folicular e regridem rapidamente (7 a 10 dias após desova), sem deixar marcas nos ovários (Drummond et al., 2000; Bazzoli, 2003; Grier et al., 2007; Santos et al., 2008; Thomé et al., 2012; Melo et al., 2015). Diferentemente do corpo lúteo encontrado em ovários de mamíferos, os FPOs não apresentam atividade hormonal (Selman & Wallace, 1989).

A atresia folicular é um processo natural em ovários de vertebrados que culmina com a reabsorção do ovócito e é importante no controle da fecundidade de uma espécie de peixe (Guraya, 1986). Atresia é mais frequente em folículos vitelogênicos residuais pós-desova, mas pode ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento ovariano (Miranda et al. 1999; Shanbhag & Saidapur, 1996). Durante atresia folicular ocorre fragmentação do envoltório nuclear com a liberação do material genético, alterações das organelas citoplasmáticas, liquefação do vitelo, formação de fendas na zona pelúcida, hipertrofia das células foliculares para reabsorção do vitelo culminando com apoptose das células foliculares e formação de cicatriz de tecido conjuntivo, que pode acumular pigmentos castanho-amarelados (corpos amarelos) associados a vasos sanguíneos e fibras conjuntivas (Miranda et al. 1999, Santos et al., 2005, 2008; Lubzens et al., 2010). A regressão dos ovários não desovados é um processo prolongado, variando de quatro a sete meses, dependendo da espécie e condição de estocagem dos peixes (Miranda et al., 1999). Este processo pode ser causado por vários fatores, tais como alterações hormonais, luz e temperatura inadequados, jejum, confinamento, entre outros fatores (Nagahama, 1983). Altos índices de atresia reduzem a fecundidade de uma espécie e podem acarretar problemas na desova (Arantes et al., 2010, 2011).

1.4 Parâmetros sanguíneos e estresse

O sangue é um tecido conjuntivo de propriedades especiais, possui matriz extracelular líquida, com constituição de 90% de água, 7% de proteínas, além de compostos metabólitos como hormônios, enzimas e eletrólitos variados (Ranzani-Paiva et al., 2013). A porção figurada do sangue é representada por eritrócitos, leucócitos e trombócitos cuja origem, desenvolvimento e função não são conhecidos por completo nos peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Distúrbios hematológicos que surgem com a evolução dos processos patológicos são imprescindíveis para o estudo da patogenia das enfermidades que acometem os peixes, já que a ocorrência de determinados

distúrbios indicam a resposta do organismo à injúria (Satake et al., 2009). A resposta imunológica dos peixes pode sofrer os efeitos diretos do estresse agudo ou crônico, causados por agentes agressores, levando a uma significativa redução na sua resistência a doenças (Barton & Iwama, 1991; Barcellos et al., 2004).

O estresse é uma condição na qual a homeostase é ameaçada ou perturbada por ação de estímulos intrínsecos ou extrínsecos definidos como estressores, que podem ser físicos, químicos ou biológicos (Bonga, 1997). É um fenômeno comum na atividade de criação, sendo o sucesso da piscicultura dependente da manutenção de condições adequadas de saúde e bem estar dos indivíduos que só são possíveis quando a homeostase biológica é preservada (Urbinati et al., 2015). De acordo com Selye (1985) o estresse pode ser dividido em duas fases: eustresse e distresse. O eustresse ocorre como uma resposta do organismo em situações que provoquem mudanças fisiológicas que otimizam seu desempenho biológico, como o exercício. O distresse ocorre quando determinado fator promove alterações fisiológicas em que um organismo pode comprometer sua integridade. A resposta ao estresse em peixes tem sido amplamente categorizada em respostas primária, secundária e terciária. As primárias iniciam imediatamente após a presença do estressor, em nível neuroendócrino; as secundárias são resultantes da ação neuroendócrina e envolvem muitos órgãos e tecidos e as terciárias são caracterizadas pela perda da capacidade adaptativa e exaustão dos sistemas biológicos (Barton & Iwama, 1991; Bonga, 1997; Iwama et al., 1999; Urbinati et al., 2014).

As respostas primárias ao estresse (estresse agudo) em peixes envolvem dois componentes distintos, o sistema simpático-cromafim e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), embora o sistema esteja sob influência de inúmeros outros hormônios (Urbinati et al., 2014). No primeiro componente, o sistema nervoso simpático, ativado em segundos após percepção da presença do estressor, atua sobre as células cromafins do rim cefálico que secretam as catecolaminas (CAs), adrenalina e noradrenalina. No segundo componente (HHI), os sinais do estressor ativam núcleos do hipotálamo, que secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), induzindo a produção de corticotropina (ACTH) pela hipófise. A ACTH por sua vez, estimula as células interrenais também no rim cefálico, a produzirem glicocorticoides, especialmente o cortisol, hormônio periférico que atuará na organização das respostas adaptativas

secundárias de ajuste homeostático nos órgãos e tecidos (Bonga, 1997; Urbinati et al., 2014). A localização próxima das células cromafins e tecido interrenal sugere uma relação parácrina entre as catecolaminas e o cortisol (Reid et al., 1996).

As respostas secundárias ocorrem em consequência da liberação dos hormônios do estresse durante a resposta primária (Barton & Iwama 1991). A hiperglicemia relacionada ao estresse relatada em muitas espécies de teleósteos é mediada principalmente pelos efeitos das CAs que elevam a glicogenólise hepática. Além disso, as CAs modulam as funções cardiovascular e respiratória (Reid et al., 1998). O cortisol liberado através da ativação do eixo HHI atua na manutenção dos níveis sanguíneos elevados de glicose e recuperação do glicogênio hepático e no balanço hidromineral tendo tanto ação glicocorticoide, quanto mineralocorticoide (Urbinati et al., 2014).

À medida que o estímulo estressor permanece sobre o animal a resposta terciária se instala (estresse crônico). A manutenção da secreção aumentada do hormônio do estresse, o cortisol, promove uma redistribuição de energia para funções prioritárias de sobrevivência, o que afeta o animal como um todo, prejudicando seu desempenho biológico, seu padrão comportamental, e as funções normais do sistema imunológico que facilitam a infestação dos peixes por patógenos. Estressores de natureza crônica levam o organismo ao comprometimento dos estoques energéticos, perda de apetite, redução da capacidade adaptativa e falhas reprodutivas e imunológicas (Bonga, 1997; Urbinati et al., 2015).

Neste contexto, as variáveis hematológicas e bioquímicas são de grande valia para a piscicultura, pois podem ser utilizadas como indicadores biológicos no monitoramento da saúde dos peixes e do ambiente ao qual estão expostos. Além disso, as análises de metabólitos de alta influência estressora como colesterol e glicose podem ser utilizadas em conjunto com as análises quantitativas de células sanguíneas a fim de avaliar o estado clínico e produtivo do animal, além de constituírem ferramentas rápidas na identificação do estresse, principalmente quando em cativeiro, onde as infecções por parasitos são inevitáveis e muitas vezes devastadoras (Bonga, 1997). Estas informações podem ser valiosas para a padronização das condições ideais para o cultivo (Dias et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Muitas espécies de peixes nativas brasileiras apresentam características de grande interesse para a piscicultura, porém necessitam ser mais estudadas. A piscicultura com espécies nativas possui a vantagem de ser mais segura, oferecendo riscos menores ao ecossistema. Apesar de ter sido pioneiro nos trabalhos de reprodução induzida (Ihering & Azevedo, 1934) e muitos trabalhos terem sido desenvolvidos com diversos gêneros, poucos peixes nativos de valor comercial no Brasil, possuem estudos conclusivos em vistas de atraírem investimentos que assegurem confiabilidade para a sua efetiva inserção. Tais estudos necessitam ser priorizados, pois muitas espécies nativas que apresentam grande representatividade na economia pesqueira de águas interiores brasileiras encontram-se ameaçadas de extinção (Tenório, 2003, Costa et al., 2015).

O rio São Francisco possui 244 espécies de peixes de água doce com alto grau de endemismo (Melo et al., 2016a) que encontram-se ameaçadas pela poluição industrial, doméstica e agrícola, desmatamento das matas ciliares, garimpo, extrativismo mineral, pesca predatória, destruição de várzeas e lagoas marginais, introdução de espécies exóticas e alóctones e instalação de grandes empreendimentos como barreiras de usinas hidrelétricas (Sato & Godinho, 1999; Godinho & Godinho, 2003). Os barramentos de rios, por exemplo, afetam negativamente a reprodução tanto de espécies de peixes reofílicas como o curimatã (*Prochilodus argenteus*) e o dourado (*Salminus brasiliensis*), quanto sedentárias como o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), que por ser espécie de hábito bentônico fica impossibilitada de ocupar seu habitat devido às grandes profundidades geradas pelos represamentos (Tenório, 2003; Arantes et al., 2010; Freitas et al., 2013). Em função destas intervenções, as populações selvagens de pacamã decaíram sensivelmente e atualmente estão vulneráveis à extinção (MMA, 2014). Várias empresas atuam na manutenção e revitalização da ictiofauna no rio São Francisco, a exemplo da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (Codevasf), Centro de Referência em Aquicultura e Recursos Pesqueiros do São Francisco (Ceraqua-SF) e através da Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA) pertencente à Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (Chesf), onde o pacamã está inserido no programa de peixamento desde o ano de 1995 (Tenório, 2003; Luz et al., 2011; Lopes et al., 2013).

Dentre as espécies de água doce, os bagres são muito apreciados e, em sua maioria, apresentam excelente desempenho zootécnico (Cielo, 2000). Dentre eles, destaca-se o pacamã *L. alexandri*, espécie que possui grande potencial zootécnico, pois apresenta alto valor de mercado devido à carne saborosa, avermelhada, livre de espinhos intramusculares, sendo bastante apreciada pelo consumidor, além de ser uma espécie de fácil manejo, resistente a doenças (Tenório, 2003; Luz & Santos, 2008b) e com rendimento de carcaça em torno de 84% (Meurer et al., 2010). Dentre os trabalhos realizados com essa espécie em cativeiro, destacam-se aqueles relacionados à ontogênese larval (Guimarães-Cruz et al., 2014), larvicultura e alevinagem (Cardoso et al., 1996; Luz & Santos 2008a,b; Santos & Luz, 2009; Pedreira et al., 2009; Luz et al., 2011; Martins et al., 2014) e nutrição (Melillo Filho et al., 2014; Takata et al., 2014; Kitagawa et al., 2015). No tocante à biologia reprodutiva, poucos estudos foram realizados: 1) indução da desova por hipofiseção (Santos et al., 2013), 2) parâmetros reprodutivos em condições naturais (Barros et al., 2007) e 3) capacidade reprodutiva de pacamãs selvagens submetidos ao regime de cativeiro (Costa et al., 2015).

Como demonstrado, poucas informações foram publicadas sobre parâmetros reprodutivos e de saúde desta espécie, tanto em ambiente natural, quanto em cativeiro, sendo as tecnologias para a sua produção ainda incipientes. Deste modo, considerando a importância social, econômica e ecológica desta espécie para os programas de propagação da espécie em ambiente natural e para o cultivo comercial visando o aumento da produção de peixes nativos cultivados, pretende-se com essa dissertação, adicionar novos conhecimentos acerca dos parâmetros reprodutivos relacionados à gametogênese e maturação gonadal, e parâmetros sanguíneos associados ao monitoramento da saúde desta espécie em condições de cativeiro.

2.1 Objetivo geral

Analisar a gametogênese e maturação gonadal do pacamã *Lophiosilurus alexandri* em condições de cultivo, relacionando parâmetros reprodutivos com as condições fisiológicas dos peixes.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os principais indicadores fisiológicos e reprodutivos de cada exemplar;
- Quantificar a foliculogênese e a espermatogênese;
- Determinar níveis de vitelogenina (Vtg) e proteínas da zona radiata (Zrps) em amostras de fígado de machos e fêmeas através de ensaio ELISA, relacionando-os com a maturação gonadal;
- Determinar os níveis plasmáticos de esteroides sexuais, relacionando-os com a gametogênese e maturação gonadal;
- Avaliar alterações hematológicas e bioquímicas;
- Analisar a nível ultraestrutural as células das linhagens ovogênica;
- Determinar a fecundidade de fêmeas maduras em cativeiro.

3. METODOLOGIA

3.1 Amostragem dos peixes e índices biológicos

O experimento foi conduzido nas instalações do Laboratório de Aquicultura (LAQUA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais no período de abril a junho de 2015. O plantel de reprodutores utilizado compunha-se de espécimes adultos de *Lophosilurus alexandri*, primeira geração filial de progenitores selvagens submetidos à reprodução artificial em laboratório, realizada no ano de 2009.

Exemplares de *L. alexandri* previamente acondicionados em tanque com 10.000 L de água a 23°C (tanque 1) (Fig. 2A) foram transferidos e mantidos em um tanque circular com 3.000 L de água aquecida artificialmente à 27°C (tanque 2) (Fig. 2B), com o propósito de induzir a atividade reprodutiva. A temperatura estabilizou-se à 27°C com cerca de uma semana. Ambos os tanques possuíam revestimento de geomembrana. Foram utilizados 55 peixes para o estudo e a sexagem foi feita através da análise comparativa das papilas genitais utilizando uma cânula para confirmar a identificação das fêmeas, totalizando 27 machos e 28 fêmeas (Lopes et al., 2013). A alimentação dos peixes foi realizada diariamente no período da tarde, até a saciedade aparente e consistiu em uma dieta extrusada comercial (40% de proteína bruta), o remanescente era recolhido 30 minutos após a alimentação. O fotoperíodo foi mantido em 10 horas de luz.

O controle da qualidade da água foi realizado através da sifonagem de resíduos, renovação semanal da água do tanque (50% do volume total) e através da instalação de um difusor de ar. A água foi mantida aquecida à temperatura ideal com a utilização de termostatos. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados diariamente para que estivessem nos níveis adequados para o cultivo, através uma sonda multiparâmetro (Horiba U-51) (média \pm DP – temperatura: 27,13 \pm 0,76 °C, amplitude: 26,11-28,23 °C; oxigênio dissolvido 7,58 \pm 1,13 mg/L, amplitude 6,06-10,13 mg/L; pH: 7,13 \pm 0,25, amplitude 6,58-7,53; condutividade elétrica: 0,20 \pm 0,004 mS/cm, amplitude 0,19-0,21 mS/cm; sólidos dissolvidos totais: 0,13 \pm 0,003 g/L, amplitude 0,12-0,13 g/L). As concentrações de amônia total foram aferidas através do kit da Labcontest e permaneceram abaixo de 1,0 mg/L.

Foram realizadas quatro amostragens durante o experimento, que teve a duração total de 70 dias. A primeira, Tempo 1 (T1) = dia 0, água a 23°C, foi realizada anteriormente à transferência dos peixes para o tanque com água aquecida e as subsequentes após transferência para o tanque com água aquecida (T2 e T3). Tempo 2, (T2) = 20 e 40 dias, água a 27°C e Tempo 3 (T3) = 70 dias, água a 27°C. Os tempos de 20 e 40 dias foram agrupados para expressar melhor os resultados obtidos (T2). Dois casais de *L. alexandri* dos 55 peixes foram colocados em tanque de fundo de areia com água aquecida à 27°C para verificar a formação de ninhos e eventos de desova. O monitoramento dos tanques foi realizado diariamente e o comportamento dos peixes foi observado em toda a extensão, para verificar a ocorrência de desovas.

Para a coleta de amostras dos tecidos, os peixes foram eutanasiados em solução de eugenol 285 mg/L. A manipulação dos peixes foi realizada seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com os devidos cuidados para evitar o sofrimento do animal e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da UFMG (protocolo CEUA 396/2012).

Os seguintes dados biométricos e indicadores fisiológicos e reprodutivos foram obtidos de cada peixe: comprimento total (CT), peso corporal (PC), peso das gônadas (PG), peso do fígado (PF), peso do estômago (PE). A partir destes dados foram calculados os índices: gonadossomático ($IGS = 100 \times PG/PC$), hepatossomático ($IHS = 100 \times PF/PC$), de repleção estomacal ($IRE = 100 \times PE/PC$) e o fator de condição de Fulton ($K = 100 \times PC/CT^3$). Amostras de sangue, gônada, fígado e estômago foram coletadas para análises dos parâmetros reprodutivos e condição de saúde dos peixes.



Figura 2. Tanques utilizados para acondicionamento dos exemplares de *L. alexandri* do presente estudo. A) Tanque 1: tanque retangular com capacidade de 10.000 L. B) Tanque 2: tanque circular com capacidade de 3.000 L. Fonte: arquivo pessoal.

3.2 Hematologia e bioquímica sanguínea

Amostras de 3,0 a 5,0 mL de sangue de machos e fêmeas foram coletadas com seringas não heparinizadas mediante a punção da artéria caudal. Os níveis de glicose sanguínea (mg/dL) foram aferidos através de um dispositivo eletrônico (Accu-Chek Active; Roche Diagnosis[®]) e checados em amostras de soro por meio do perfil bioquímico utilizando um aparelho automático (Cobas-Mira Plus). Das amostras coletadas foram determinados valores de hematócrito, a partir de tubos capilares preenchidos com aproximadamente 2/3 de sangue previamente homogeneizado e centrifugado durante 10 min a 10.000 rpm. A leitura foi realizada de acordo com a técnica do microhematócrito, validada por Goldenfarb et al. (1971). A determinação de proteína plasmática total (PPT) foi realizada por meio da técnica de refratometria (Jain, 1986). Para as contagens de eritrócitos e leucócitos o sangue foi previamente diluído em solução Dacie e as células posteriormente contadas manualmente em hemocítômetro (Câmara de Neubauer) até 24 horas após a coleta sanguínea.

3.3 Níveis hormonais

Alíquotas das amostras de sangue coletadas foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas por 5 min (1.000 rpm por 1 min e 3.000 rpm por 4 min) para a separação da fração líquida. Frações de aproximadamente 200 µL de soro foram congeladas a -80°C para posterior análise. As concentrações séricas dos hormônios foram determinadas através de kits comerciais de ensaio de ELISA, método competitivo, seguindo o protocolo do fabricante: 17β-estradiol (Estradiol ELISA Kit *Item № 582251* Cayman Chemical Company) e 17α-hidroxiprogesterona (DRG[®] 17-α-OH Progesterone ELISA EIA-1292) em fêmeas, 11-ketotestosterona (11-keto Testosterone ELISA Kit *Item № 582751* Cayman Chemical Company) em machos e Cortisol (DRG[®] Cortisol ELISA EIA-1887) em machos e fêmeas. A sensibilidade dos ensaios foi de 15 pg/mL (17β-E); 0.034 ng/mL (17α-OHP) e 1.3 pg/mL (11-KT). A reatividade cruzada dos ensaios foi inferior a < 14.5% (17β-E e outros estrógenos); < 1.4% (17α-OHP e outros estrógenos); < 3% (11-KT e outros andrógenos).

3.4 Análises histológicas e ultraestruturais

Amostras de ovários e testículos foram fixadas em líquido de Bouin por 24 h à temperatura ambiente, incluídas em parafina, seccionadas a 4-6 μm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou tricrômico de Gômori e observadas em microscópio de luz. Algumas amostras também foram submetidas às técnicas histoquímicas do ácido periódico de schiff (PAS) e Alcian Blue (AB) pH 2.5 e contra-coradas com hematoxilina.

Para análise ultraestrutural, amostras de ovários foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3) por 24 h a 4°C. Após a fixação primária, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% reduzido com ferrocianeto de potássio 1,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 durante 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em etanol, infiltrados e incluídos em resina Epon/Araldite. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 – Spirit Biotwin FEI - 120 kV.

3.5 Morfometria

O diâmetro médio dos folículos vitelogênicos e a altura das células foliculares foram determinados em cortes histológicos de fêmeas maduras, onde 100 folículos íntegros, esféricos e com pouca retração foram analisados para cada tempo de amostragem. As medidas foram obtidas com o auxílio do software Zeiss AxioVision 4.8, utilizando-se as objetivas de 2,5x e 20x respectivamente. A proporção (%) das células da linhagem ovogênica, folículos pós-ovulatórios e corpos amarelos também foi obtida em cortes histológicos transversais de cada exemplar fêmea (N = 28). O índice de atresia folicular foi determinado pela proporção de folículos vitelogênicos atrésicos em relação ao número total de folículos vitelogênicos de cada corte histológico (N = 28).

Nos machos, foram avaliados os seguintes parâmetros: diâmetro dos túbulos seminíferos, número de cistos por túbulo seminífero e proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular (células espermatogênicas e intersticiais). O

diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi obtido com auxílio do software Zeiss AxioVision 4.8 medindo-se 100 túbulos por tempo de amostragem com objetiva de 20x. De cada espécime (N = 27) foram obtidas 5 imagens digitais de secções histológicas não sequenciais de testículos em maturação, utilizando sistema de análise de imagens Axio Vision 4.8 acoplado ao fotomicroscópio Axioplan 2 da Zeiss com ampliação de 40x. A proporção (%) das células germinativas foi então determinada com auxílio do software Image J (versão 1.49) onde foram projetados 494 pontos equidistantes totalizando 66.690 pontos totais analisados.

3.6 Fecundidade

Para determinar a fecundidade, amostras (~1 g) de ovários maduros (6 fêmeas do T3) foram pesadas e mantidas em solução de Gilson modificada (100 mL de álcool etílico 60%, 880 mL de água destilada, 15 mL de ácido nítrico 80%, 18 mL de ácido acético glacial e 20 g de cloreto de mercúrio) até que os ovócitos vitelogênicos estivessem completamente dissociados. Após a dissociação, os ovócitos vitelogênicos das amostras foram separados (cor acastanhada e grande tamanho) e contados manualmente utilizando-se estereomicroscópio. Folículos atrésicos (esbranquiçados) foram excluídos das contagens. A fecundidade absoluta (FL) em lotes foi calculada através da fórmula: $FL = NO \times PG/PA$, no qual NO é o número de ovócitos vitelogênicos na amostra; PG é o peso do ovário e PA é o peso da amostra.

3.7 Proteínas da zona radiata (Zrps) e vitelogenina (Vtg)

Amostras de fígado de machos e fêmeas previamente armazenadas em freezer - 80°C foram submetidas ao ensaio de ELISA indireto para detecção de Zrps e Vtg. Amostras congeladas foram homogenizadas em tampão de extração (50mM Tris-HCL pH 8.0 com 0.02% aprotinina e 1mM fenilmetilsulfonil) a uma proporção de 1:2 de peso do tecido, utilizando homogeneizador Potter S (Braun, Melsungen, Alemanha). Em seguida os extratos foram sonicados por processador ultrassônico GEX 600 CE e centrifugados a 15.000 g por 60 min a 4°C. Após a remoção do pellet, os sobrenadantes foram armazenados em alíquotas a -80°C até a análise. Proteínas solúveis totais contidas nos homogenatos de fígado foram determinadas pelo método de Bradford utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Amostras em triplicatas de 100 µg/ml (Vtg

e Zrps) foram incubadas por 1 h em microplacas de 96 poços (Nunc, Dinamarca), bloqueadas com BSA 2% por 45 min e incubadas novamente a 37°C por uma hora com os anticorpos primários: policlonal de coelho anti-Vtg e policlonal de salmão anti-Zrp na diluição de 1:500 (Biosense Laboratories AS, Noruega). Após lavagem com PBS-Tween 0.05%, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG (1:1000, Sigma, St. Louis, MO) conjugado com peroxidase (HRP) por 1 h a 37°C. Após lavagem, a reação foi revelada com 100 µl de 0.04% o-fenilenodiaminadihidroclorato (OPD) (Sigma, St. Louis, MO, USA) em 0.05 M solução de tampão fosfato-citrato com 0.0025% de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida através da adição de 50 µl de H₂SO₄ a 5% em cada poço e a absorbância foi mensurada a 492 nm utilizando espectrofotômetro BioTek® Instruments Inc. Para a validação do ensaio de ELISA, curvas de diluição do homogenato foram feitas para cada proteína analisada (Fig. 3).

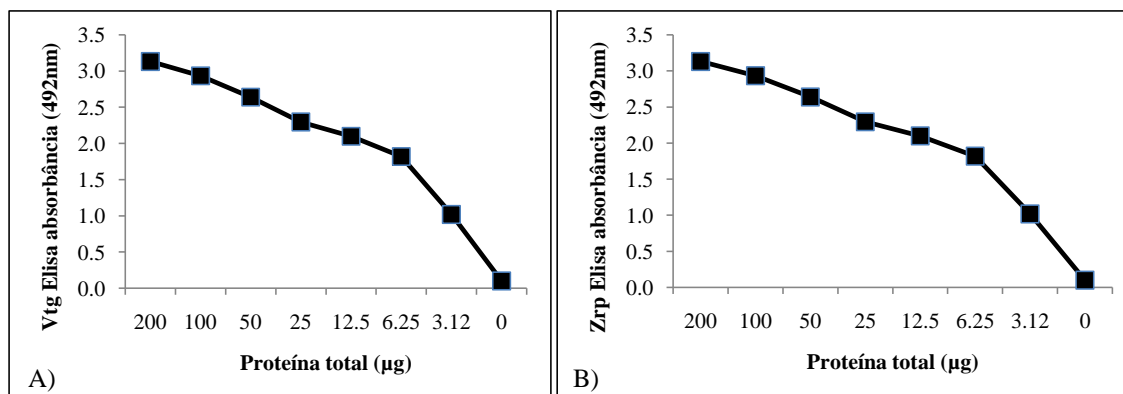


Figura 3. Curvas de diluição dos ensaios de ELISA de A) vitelogenina (Vtg) e B) proteínas da zona radiata (Zrps) hepáticas de *L. alexandri*.

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos através dos softwares, BioEstat 5.0 e Graphpad Prism 6. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP), sendo considerados significativos quando $p < 0,05$. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Lilliefors para verificação de normalidade. O teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para analisar os índices biológicos, parâmetros morfométricos, espermatogênese, níveis hormonais, expressão de Zrps/Vtg e parâmetros sanguíneos. O teste G de aderência foi utilizado para identificar diferenças significativas entre as proporções de estruturas ovarianas, índice de atresia folicular e níveis de 11-ketotestosterona entre os tempos de amostragem. O teste t de Student foi utilizado para identificar diferenças de CT e PC entre machos e fêmeas.

4. RESULTADOS

4.1 Indicadores biológicos dos peixes

Não houve diferenças significativas no CT e PC entre fêmeas ($44, 87 \pm 3,56$ cm; $0,51 \pm 0,42$ Kg) e machos ($43,33 \pm 11,93$ cm; $0,46 \pm 0,38$ Kg) ($p = 0,1478$; $0,1573$), respectivamente, evidenciando a inexistência de dimorfismo sexual aparente nesse estudo. Em relação aos índices biológicos, o índice de repleção estomacal (IRE) decresceu e foi significativamente menor no T3 para machos (IRE = $0,95 \pm 0,06$; $p = 0,0100$) e em fêmeas não houve diferenças significativas. O índice gonadossomático (IGS) de fêmeas foi significativamente maior no T3 (IGS = $3,56 \pm 0,25$; $p = 0,0007$) quando comparado aos outros tempos de amostragem e não houve diferenças significativas para machos (Tabela 1). O índice hepatossomático (IHS) não apresentou diferenças significativas entre os grupos para ambos os sexos. O fator de condição de Fulton (K) foi similar nos diferentes grupos experimentais tanto para machos quanto para fêmeas (Tabela 1).

4.2 Maturação gonadal e fecundidade

Os ovários em maturação apresentam coloração amarelada, vascularização e volume aumentados, e ovócitos visíveis a olho nu (Fig. 4B). Com relação à distribuição das frequências (%) dos estádios de maturação gonadal, no T1 foram encontradas fêmeas em repouso (7,69), maturação (30,77) e regressão (61,54), no T2 em maturação (62,50) e regressão (37,50) e no T3 foi encontrada a maior frequência de fêmeas em maturação (85,71) além de fêmeas com ovários em regressão (14,29) (Figuras 5 e 6A-H). No T1 (peixes mantidos em água a 23°C), algumas fêmeas (23,08%) apresentaram a maioria dos folículos vitelogênicos em atresia (Fig. 6E). Apesar da atresia folicular, algumas secções de ovários apresentaram folículos pós-ovulatórios típicos, evidência histológica de ovulação (Figuras 6G-H). Entretanto, durante os 70 dias de tratamento com água aquecida não foi observada a presença de desova no fundo do tanque, mesmo em tanques com fundo de areia para formar ninhos. Atresia folicular em diferentes fases de regressão ocorreu na maioria das lâminas, especialmente em fêmeas do T1, sendo predominante em folículos vitelogênicos e eventualmente em folículos pré-vitelogênicos (Fig. 7B-E). Além da alta incidência da atresia folicular, foram também

observados folículos perinucleolares apresentando áreas vacuoladas próximas ao núcleo (Fig. 7A).

A fecundidade absoluta de fêmeas de *L. alexandri* mantidas em cativeiro durante 70 dias em água aquecida a 27 °C variou de 5.449,36 a 12.581,74 entre fêmeas, com média (\pm DP) de $8.187,21 \pm 2.356,31$ ovócitos vitelogênicos.

Nos machos, testículos estavam em maturação em todos os exemplares (Fig. 8), apresentando franjas mais desenvolvidas e volumosas na maior parte da gônada (região cranial) (Fig. 4A). Histologicamente, os túbulos seminíferos da região cranial apresentaram cistos de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (Fig. 8A), alguns exemplares tinham túbulos repletos de espermatozoides, (Fig. 8C) e presença de espermatozoides no ducto espermático (Fig. 8D), caracterizando o estágio maduro. Quantidade variada de espermatozoides e secreção foi observada no lume dos túbulos da região caudal (Fig. 8B).

Ademais, foi detectado intersexo em 11% dos exemplares macro e microscopicamente classificados como machos. Nestas gônadas os folículos ovarianos desenvolveram-se perfeitamente, apresentando-se em pequenos grupos ou isoladamente nos compartimentos tubular e/ou intersticial, havendo desorganização mínima da estrutura tecidual (Fig. 8E-G).

Tabela 1. Variáveis e índices biológicos de fêmeas e machos de *L. alexandri* sob condições de cultivo.

		T1	T2	T3
Fêmeas	N	13	8	7
	CT (cm)	43,66 ± 0,94 ^b	43,74 ± 0,78 ^{ab}	48,40 ± 1,15 ^a
	PC (Kg)	0,92 ± 0,06 ^{ab}	0,91 ± 0,04 ^b	1,36 ± 0,10 ^a
	IGS	0,71 ± 0,13 ^b	1,22 ± 0,29 ^b	3,56 ± 0,25 ^a
	IHS	0,99 ± 0,06 ^a	1,37 ± 0,23 ^a	1,25 ± 0,13 ^a
	IRE	1,50 ± 0,21 ^a	1,50 ± 0,14 ^a	0,99 ± 0,11 ^a
	K	1,12 ± 0,06 ^a	1,08 ± 0,02 ^a	1,19 ± 0,03 ^a
Machos	N	8	12	7
	CT (cm)	41,51 ± 0,90 ^b	42,53 ± 0,90 ^b	46,77 ± 0,98 ^a
	PC (Kg)	0,76 ± 0,10 ^a	0,89 ± 0,07 ^a	1,11 ± 0,07 ^a
	IGS	0,07 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,01 ^a
	IHS	1,06 ± 0,12 ^a	1,02 ± 0,07 ^a	0,98 ± 0,11 ^a
	IRE	1,63 ± 0,24 ^a	1,43 ± 0,12 ^a	0,95 ± 0,06 ^b
	K	1,03 ± 0,08 ^a	1,14 ± 0,03 ^a	1,08 ± 0,03 ^a

Dados são expressos como média ± EP. Amostragem dos peixes: (T1) dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; (T2) 20 a 40 dias em água aquecida a 27°C e (T3) 70 dias em água aquecida a 27°C. (CT) comprimento total; (PC) peso corporal; (IGS) índice gonadossomático; (IHS) índice hepatossomático; (IRE) índice de repleção estomacal; (K) fator de condição de Fulton. N = número de exemplares. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta, $p < 0,05$.

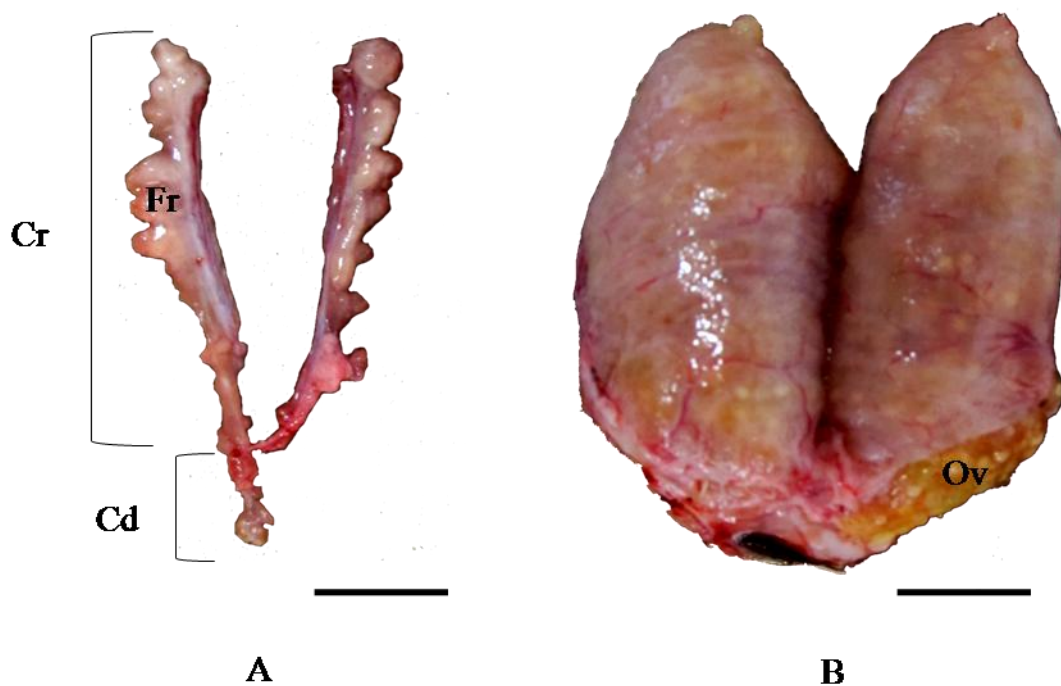


Figura 4. Características macroscópicas de testículos (A) e ovários (B) maduros de pacamã, *L. alexandri* sob condições de cultivo. Cr: região cranial; Cd: região caudal; Fr: franjas; Ov: ovócitos. Fonte: arquivo pessoal. Barras de escala = 1 cm.

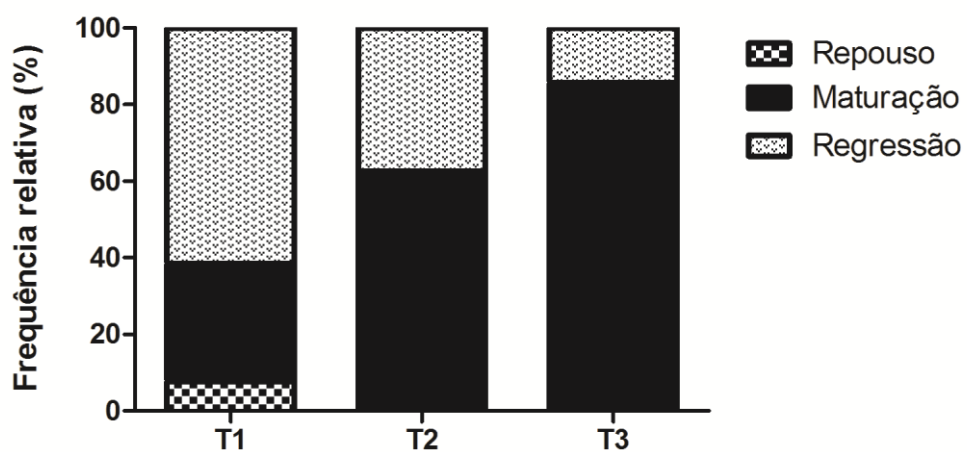
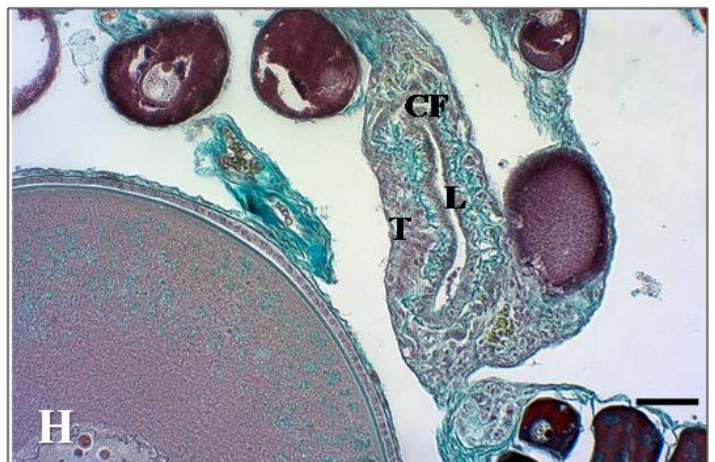
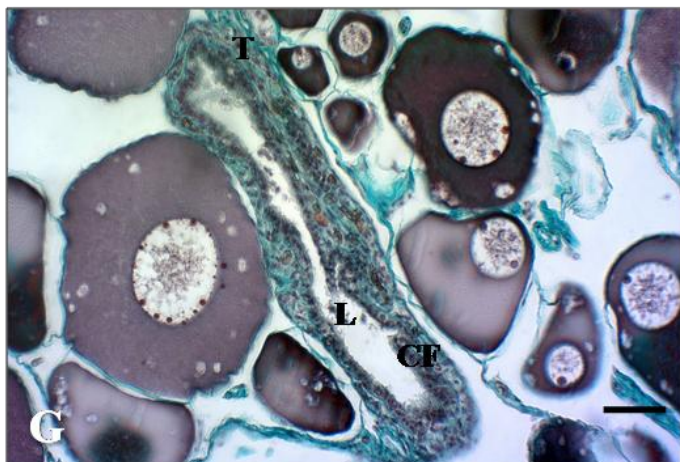
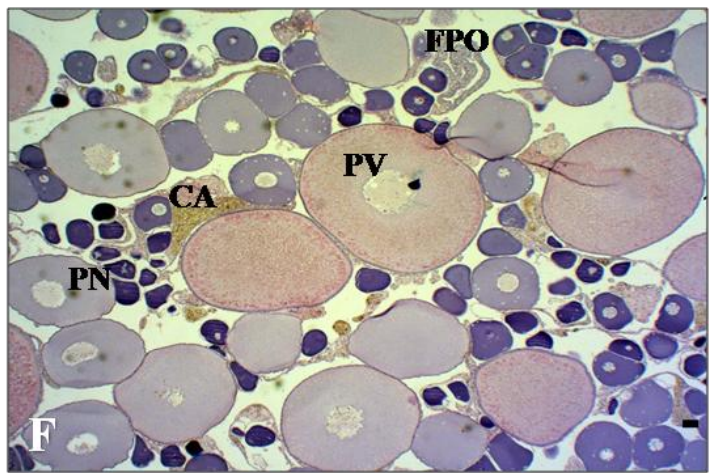
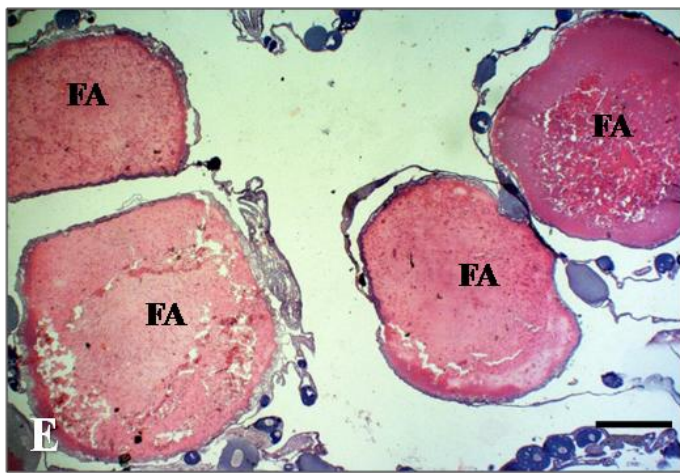
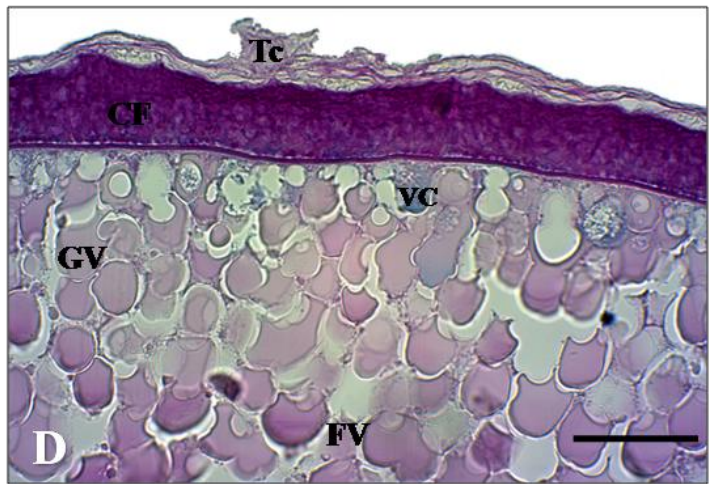
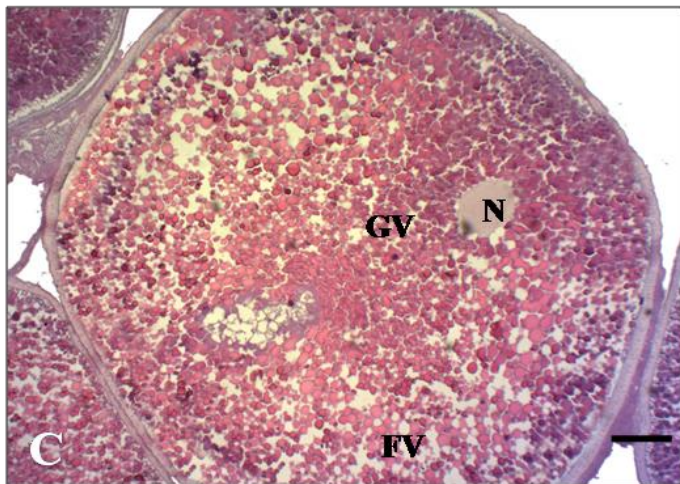
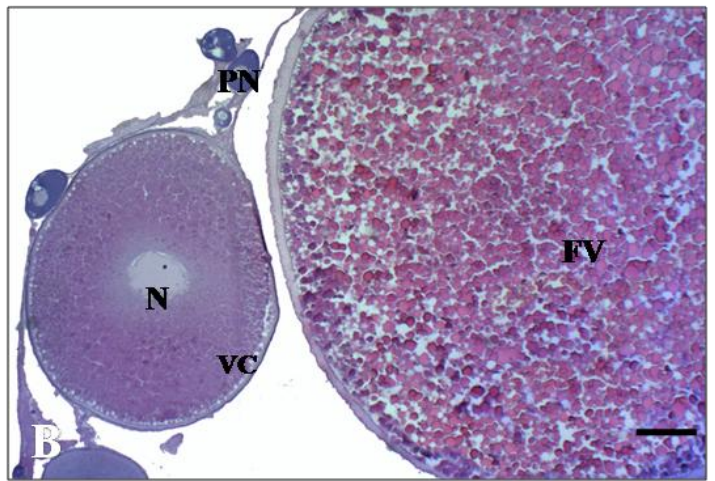
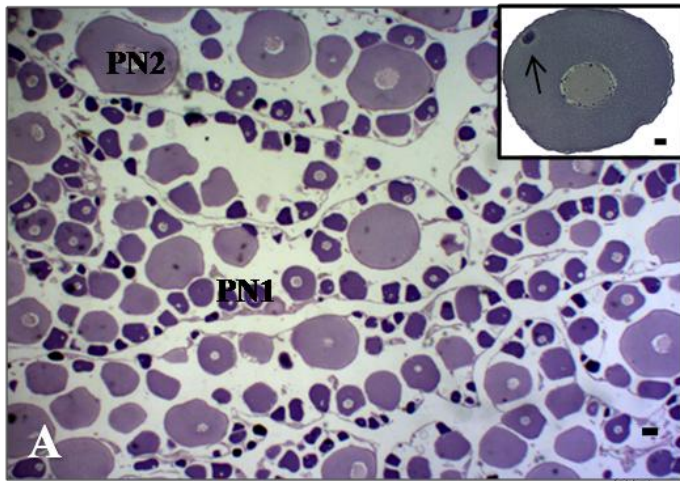


Figura 5. Frequência relativa (%) dos estádios de maturação gonadal de fêmeas de *L. alexandri*. Amostragem dos peixes: (T1) dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; (T2) 20 a 40 dias em água aquecida a 27°C e (T3) 70 dias em água aquecida a 27°C.

Figura 6. Secções histológicas de ovários de *L. alexandri* mostrando estruturas ovarianas. A) Ovário em repouso apresentando lamelas ovulíferas com predomínio de folículos perinucleolares inicial (PN1) e avançado (PN2). Encarte destacando núcleo vitelínico periférico (seta). B) Ovário em maturação com a presença de folículos perinucleolares (PN), com vesículas corticais (VC) e vitelogênicos (FV). C) Folículo vitelogênico maduro com inúmeros glóbulos de vitelo (GV) no ooplasma e núcleo excêntrico (N). D) Detalhe de um FV com células foliculares prismáticas altas (CF) PAS-positivas, vesícula cortical (VC) e teca (Tc). E) Ovário em regressão com muitos folículos vitelogênicos atrésicos (FA). F) Ovário em regressão apresentando lamelas ovulíferas desorganizadas com a presença de folículo pós-ovulatório (FPO) evidente, folículos PN e PV, e corpos amarelos (CA). G e H) Detalhes de folículos pós-ovulatórios (FPO): G) exibindo CF hipertrofiadas, teca delgada (G) ou espessada (H) e lúmen reduzido (L). Coloração em HE (A-C, E-F), PAS (D) e em tricrômico de Gômori (G-H). Barra de escala: 20 µm (A-encarte); 50 µm (G-H); 100 µm (A); 200 µm (B-C); 500 µm (E) 800 µm (D e F).



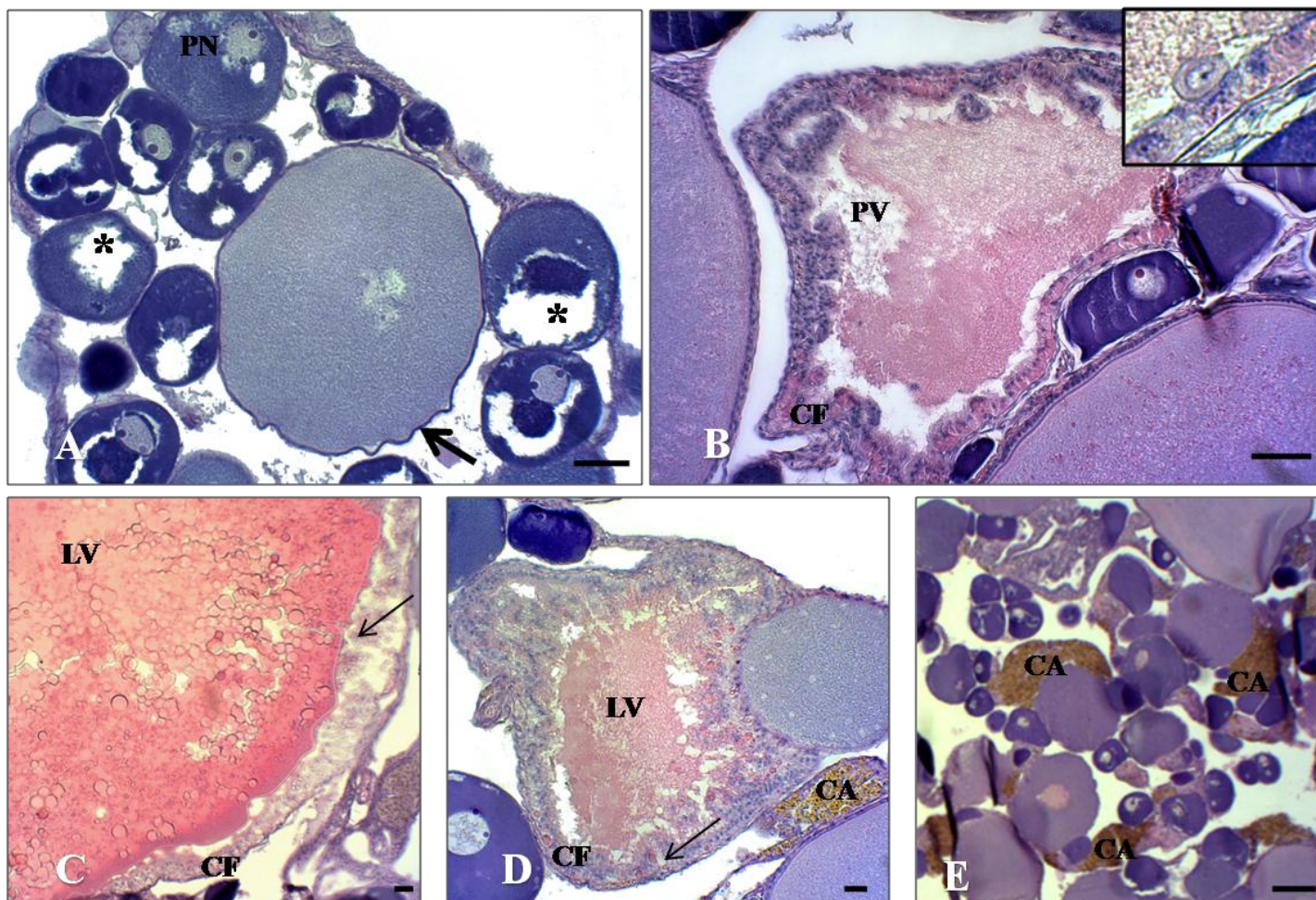
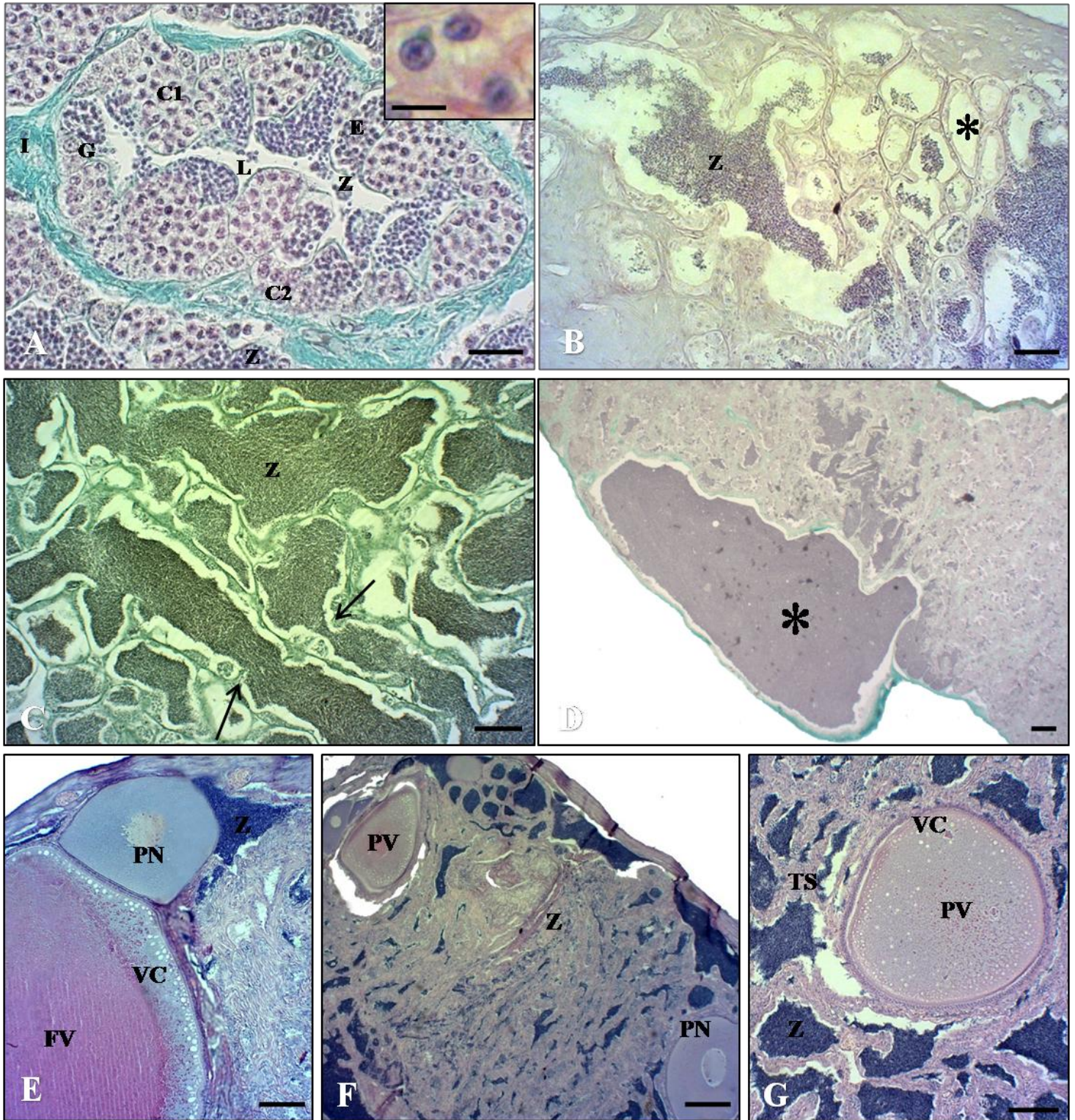


Figura 7. Secções histológicas de ovários atrésicos de *L. alexandri*. A) Folículos perinucleolares (PN) apresentando áreas vacuoladas próximas ao núcleo (*) e zona pelúcida alterada (seta). B) Folículo pré-vitelogênico (PV) atrésico com células foliculares (CF) hipertrofiadas e conteúdo do citoplasma em reabsorção. Encarte destacando célula micropilar. C) Folículo vitelogênico em atresia inicial: CF hipertrofiadas, início da liquefação do vitelo (LV), fragmentação da zona pelúcida (seta). D) Folículo vitelogênico em atresia avançada: liquefação dos glóbulos de vitelo (LV), CF com características fagocíticas (seta), desintegração da zona pelúcida e teca com pouca vascularização. E) Corpos amarelos (CA): acúmulo de pigmentos castanho-amarelados (grânulos de lipofuscina). Coloração em HE. Barra de escala: 20 μm (D); 50 μm (A-C); 100 μm (E).

Figura 8. Secções histológicas de testículos de *L. alexandri*. A) Secção transversal do túbulo seminífero mostrando cistos de células da linhagem espermatogênica em diferentes fases de desenvolvimento: espermatogônias (G), espermátocitos primários (C1) e secundários (C2), espermátide (E) e espermatozoides (Z) no lúmen (L). Encarte destacando células de Leydig. B) Região caudal exibindo atividades espermatogênica (Z) e secretora (*). C) Região cranial mostrando intensa atividade espermatogênica, com lúmen dos túbulos seminíferos repletos de espermatozoides (Z) e anastomose (setas) entre os túbulos. D) Secção longitudinal evidenciando ducto espermático (*). E-G) Gônadas de intersexo apresentando folículos perinucleolares (PN), folículos pré-vitelogênicos (PV) com vesículas corticais (VC) características e folículo vitelogênico (FV) em contato direto com túbulos seminíferos (TS) contendo espermatozoides (Z). Coloração em HE (Encarte, B, E-G) e em tricrômico de Gômori (A, C-D). Barra de escala: 20 µm (A-B e D); 100 µm (C, E e G); 200 µm (Encarte e F).



4.3 Morfometria

O diâmetro dos folículos vitelogênicos variou de 704,06 a 2239,61 μm e foi significativamente maior em fêmeas do T3 (1560,40 \pm 34,10 μm), do que em fêmeas dos tempos T1 e T2 (1266,10 \pm 26,23 e 1211,90 \pm 31,89 μm , respectivamente) ($p < 0,0001$) (Tabela 2). A altura das células foliculares variou de 3,8 a 68,14 μm e seguiu a mesma tendência das medidas do diâmetro dos folículos vitelogênicos sendo significativamente maior em fêmeas do T3 (27,18 \pm 0,81 μm), do que em fêmeas dos tempos T1 e T2 (16,39 \pm 0,49 e 18,05 \pm 0,48 μm , respectivamente) ($p < 0,0001$).

A proporção de ovogônias, folículos perinucleolares e pré-vitelogênicos manteve-se relativamente constante nos três tempos de amostragem (Tabela 2). A proporção de folículos vitelogênicos aumentou significativamente, com maiores valores no T3 (13,76 \pm 2,44; $G = 10,07$ e $p = 0,01$). Folículos vitelogênicos apresentando núcleo excêntrico (evidência da maturação final ovocitária) foram observados somente no T3 e FPOs (evidência da desova) foram pouco frequentes ($< 0,5\%$) nos três grupos. O índice de atresia folicular foi mais elevado em T1 (42,51 \pm 11,83), reduzindo significativamente em T2 e T3 ($G = 23,9196$ e $p < 0,0001$) e uma proporção de corpos amarelos, variando de 3 a 7% foi observada nos três grupos (Tabela 2).

Nos machos, o diâmetro dos túbulos seminíferos variou de 103,13 a 466,10 μm , sendo significativamente maior no T2 (265,85 \pm 6,93 μm), quando comparado ao T1 (224,29 \pm 6,62 μm) e T3 (242,21 \pm 7,01 μm) ($p = 0,0001$). Nos tempos T2 e T3 foi encontrada maior quantidade de número de cistos (10,88 \pm 1,00 e 7,38 \pm 0,55, respectivamente) ($p < 0,0001$) (Tabela 3). A proporção de células da linhagem espermatogênica foi bastante semelhante entre os tempos de amostragem, havendo diferenças significativas somente na proporção de espermatogônias, significativamente menor no T3 (4,02 \pm 0,48, $p = 0,0001$) (Tabela 3). Destaca-se a alta proporção de espermatozoides ($> 40\%$ em todos os grupos) em relação a outras fases da espermatogênese, o que é característico de peixes maduros e mais de 20% de tecido intersticial em todos os grupos (Tabela 3). A presença de espermatozoides no ducto espermático foi também observada, caracterizando a ocorrência de espermição em peixes dos três grupos (Fig. 8D).

Tabela 2. Proporção (%) das estruturas ovarianas, diâmetro dos folículos vitelogênicos, altura das células foliculares e índice de atresia folicular de fêmeas de *L. alexandri* sob condições de cultivo.

Foliculogênese	T1	T2	T3
Ovogônias (%)	18,37 ± 1,66 ^a	24,38 ± 3,23 ^a	19,68 ± 1,92 ^a
Folículos perinucleolares (%)	69,28 ± 2,01 ^a	65,27 ± 3,46 ^a	57,47 ± 2,05 ^a
Folículos pré-vitelogênicos (%)	1,92 ± 0,34 ^a	1,97 ± 0,53 ^a	2,19 ± 0,36 ^a
Folículos vitelogênicos (%)	4,28 ± 1,05 ^b	4,53 ± 1,25 ^b	13,76 ± 2,44 ^a
Folículos pós-ovulatórios (%)	0,23 ± 0,07 ^a	0,11 ± 0,06 ^a	0,04 ± 0,04 ^a
Corpos amarelos (%)	5,92 ± 1,18 ^a	3,73 ± 1,16 ^a	6,88 ± 1,84 ^a
Diâmetro dos folículos vitelogênicos (µm)	1266,10 ± 26,23 ^b	1211,90 ± 31,89 ^b	1560,40 ± 34,10 ^a
Altura das células foliculares (µm)	16,39 ± 0,49 ^b	18,05 ± 0,48 ^b	27,18 ± 0,81 ^a
Índice de atresia folicular (%)	42,51 ± 11,83 ^a	26,21 ± 16,12 ^b	8,88 ± 3,12 ^c

Dados são expressos com média ± EP. Amostragem dos peixes: (T1) dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; (T2) 20 a 40 dias em água aquecida a 27°C e (T3) 70 dias em água aquecida a 27°C. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta, $p < 0,05$.

Tabela 3. Proporção (%) das células da linhagem espermatogênica de machos de *L. alexandri* sob condições de cultivo.

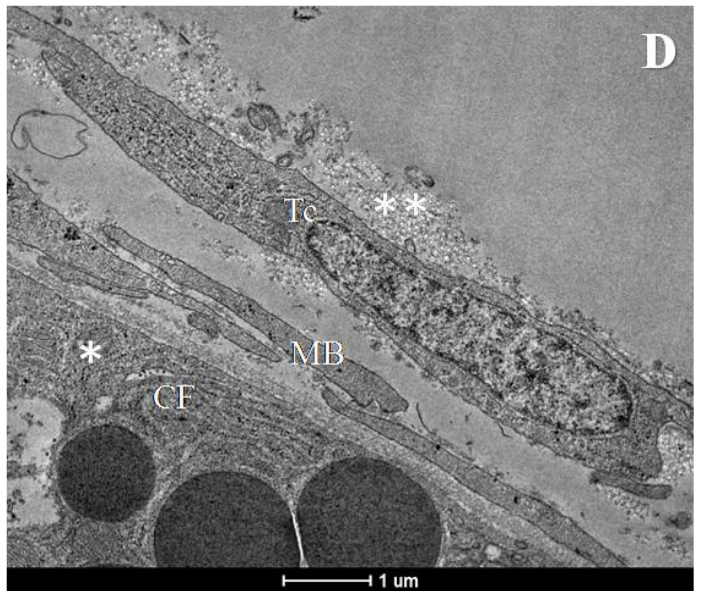
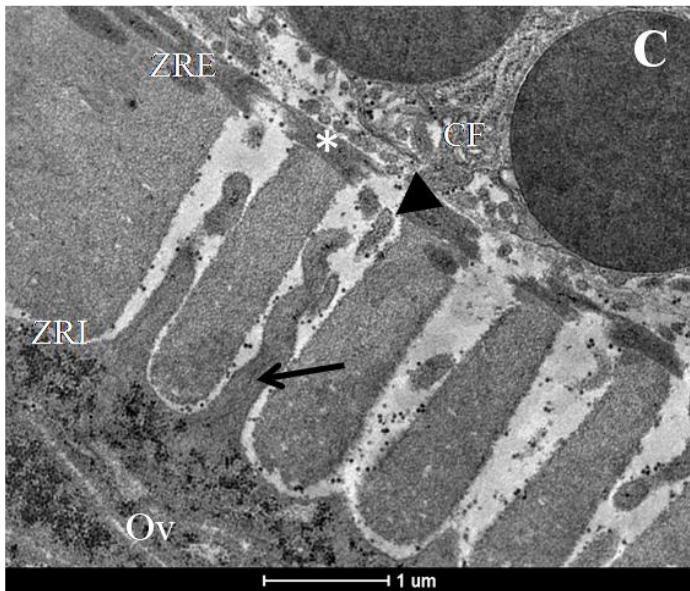
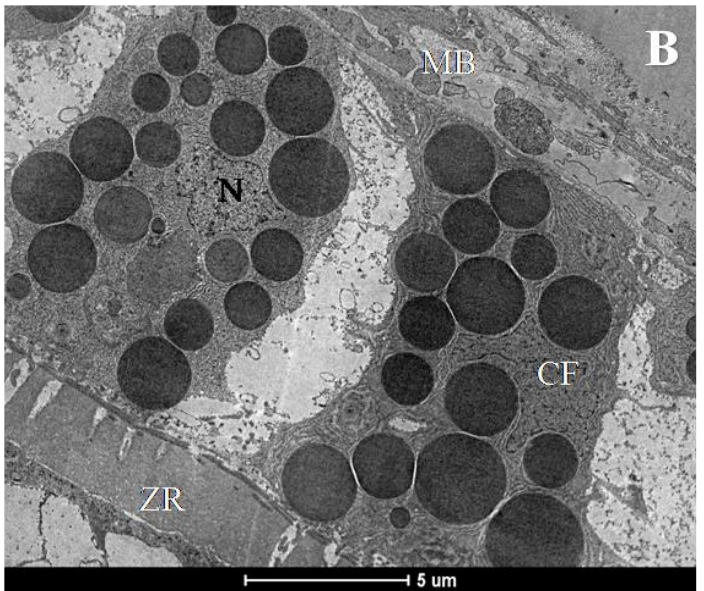
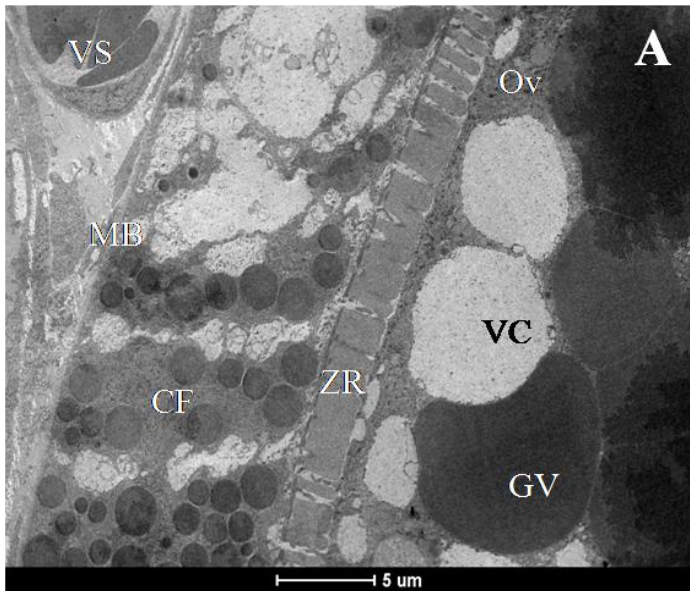
Espermatogênese	T1	T2	T3
Espermatogônia (%)	8,73 ± 0,90 ^a	6,74 ± 0,60 ^a	4,02 ± 0,48 ^b
Espermatócitos (%)	12,46 ± 1,63 ^a	17,07 ± 1,42 ^a	16,33 ± 1,89 ^a
Espermátides (%)	2,20 ± 0,39 ^a	2,22 ± 0,29 ^a	1,72 ± 0,25 ^a
Espermatozoides (%)	41,75 ± 2,99 ^a	43,00 ± 2,14 ^a	46,23 ± 3,01 ^a
Lúmen (%)	9,26 ± 0,83 ^a	7,88 ± 0,59 ^a	8,04 ± 1,09 ^a
Tecido intersticial (%)	25,61 ± 1,63 ^a	22,56 ± 1,15 ^a	24,48 ± 1,71 ^a
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	224,29 ± 6,62 ^b	265,85 ± 6,93 ^a	242,21 ± 7,01 ^b
Nº de cistos por túbulo seminífero	5,61 ± 0,70 ^b	10,88 ± 1,00 ^a	7,38 ± 0,55 ^a

Dados são expressos com média ± EP. Amostragem dos peixes: (T1) dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; (T2) 20 a 40 dias em água aquecida a 27°C e (T3) 70 dias em água aquecida a 27°C. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta, $p < 0,05$.

4.4 Ultraestrutura dos folículos vitelogênicos

Ao microscópio eletrônico de transmissão, folículos vitelogênicos apresentaram vesículas corticais elétricas lúcidas na periferia do ovócito e grânulos ou glóbulos de vitelo elétricos densos (Fig. 9A). As células foliculares prismáticas altas com núcleos vesiculosos e cromatina descompactada estavam apoiadas na membrana basal e mostraram características de células secretoras, com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e grãos de secreção elétricos densos em seu citoplasma (Figuras 9B e D). A zona radiata apresentou poros-canais, espessa camada interna atravessada por prolongamentos de ovócito e microvilosidades de células foliculares e camada externa fina voltada para as células foliculares (Fig. 9C). A teca apresentou células semelhantes a fibroblastos (Fig. 9D).

Figura 9. Ultraestrutura de folículos vitelogênicos de *L. alexandri*. A) Folículo com zona radiata (ZR), células foliculares (CF) prismáticas altas apoiadas em uma membrana basal (MB) espessa e ovócito com glóbulos de vitelo (GV) esféricos, elétrondensos e vesículas corticais (VC) periféricas com conteúdo elétron-lúcido. Acima da MB, vaso sanguíneo (VS) pertencente à teca. B) Células foliculares com materiais elétrondensos em seu citoplasma, núcleo vesiculoso e cromatina descompactada. C) Zona radiata com duas camadas totalmente desenvolvidas: interna (ZRI) com poros-canais longitudinais e externa (ZRE) voltada para as células foliculares, onde há deposição de material elétron-denso (*). Prolongamentos do ovócito (seta) e microvilos das células foliculares (cabeça de seta) preenchem os poros-canais durante a maturação ovocitária. D) Célula folicular (CF) com abundante retículo endoplasmático em evidência (*), membrana basal e teca com célula semelhante a fibroblasto (Tc) e colágeno (**).



4.5 Níveis hepáticos de vitelogenina (Vtg) e proteínas da zona radiata (Zrps)

Valores significativamente maiores de Vtg foram encontrados em fêmeas do T3 ($1,76 \pm 0,05$), quando comparados com fêmeas do T1 ($1,41 \pm 0,03$) e T2 ($1,29 \pm 0,07$) ($p < 0,0001$), onde se obteve também, maiores valores de IGS (Fig. 10A e C). Para Zrps, valores significativamente menores foram encontrados em fêmeas do T3 ($2,47 \pm 0,07$), quando comparados com fêmeas do T1 ($2,69 \pm 0,05$) e do T2 ($2,66 \pm 0,08$) ($p = 0,0080$) (Fig. 10E). Valores de Vtg expressivos e semelhantes aos encontrados em fêmeas foram detectados em machos, com menores valores no T1 em relação a T3 ($1,32 \pm 0,04$ e $1,56 \pm 0,04$ respectivamente), ($p = 0,0080$), enquanto o IGS não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figuras 10B e D). Os valores de Zrp de machos foram também similares ao de fêmeas e permaneceram praticamente constantes durante os três tempos de amostragem (Fig. 10F).

4.6 Concentrações séricas de esteroides sexuais

Em fêmeas, a concentração sérica de 17β -estradiol (17β -E) mostrou uma tendência de aumento durante a progressão do experimento, exibindo diferenças significativas entre o T3 ($98,81 \pm 14,62$ pg/mL) e o T1 ($33,64 \pm 4,79$ pg/mL) ($p = 0,0079$) e acompanhou as variações de Vtg (Fig. 10C e 11A). Em relação à concentração de 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP), não houve variações marcantes entre os diferentes tempos de amostragem, entretanto fêmeas do T3 ($1,93 \pm 0,04$ ng/mL) apresentaram valores significativamente maiores que as fêmeas do T2 ($1,75 \pm 0,03$ ng/mL) ($p = 0,0099$) (Fig. 11B).

Em machos, a dinâmica de concentração de 11-ketotestosterona (11-KT) foi semelhante à de 17β -E em fêmeas, onde maiores valores foram encontrados em machos do T3 ($75,46 \pm 14,60$ pg/mL) e T2 ($62,10 \pm 17,68$ pg/mL), quando comparados com machos do T1 ($20,92 \pm 4,07$ pg/mL) ($G = 35,1441$ e $p < 0,0001$) (Fig. 11C).

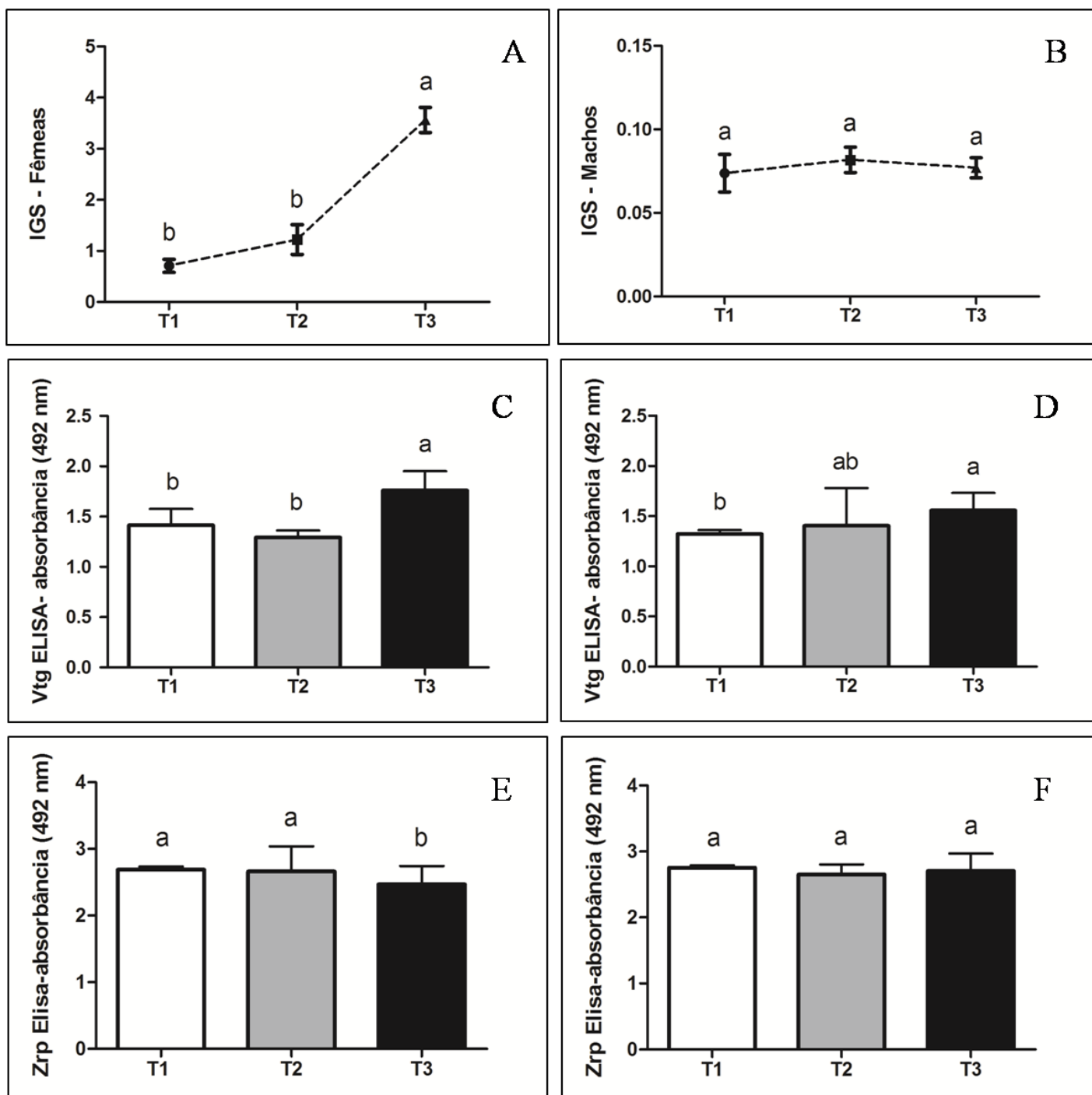


Figura 10. Variações do índice gonadosomático (IGS) de fêmeas (A) e machos (B), níveis hepáticos de vitelogenina (Vtg) em fêmeas (C) e machos (D) e proteínas da zona radiata (Zrps) em fêmeas (E) e machos (F) de *L. alexandri* nos três tempos de coleta. T1 = dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; T2 = 20 a 40 dias em água aquecida a 27°C; T3 = 70 dias em água aquecida a 27°C. Valores expressos como média ± EP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta, $p < 0,05$.

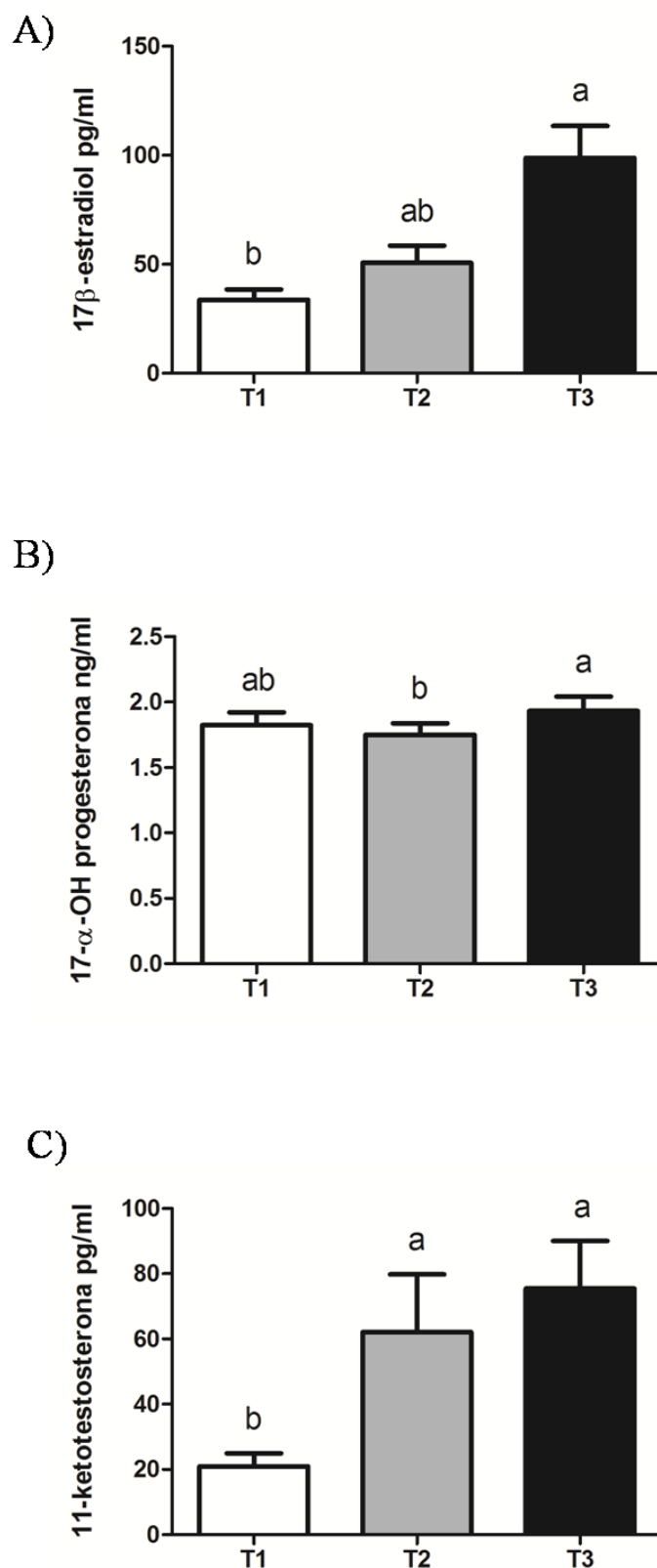


Figura 11. Concentrações séricas de 17 β -estradiol (A) e 17 α -hidroxiprogesterona (B) em fêmeas e 11-ketotestosterona (C) em machos de *L. alexandri*. T1 = dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; T2 = 20 a 40 dias em água aquecida a 27°C; T3 = 70 dias em água aquecida a 27°C. Valores expressos como média \pm EP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta, $p < 0,05$.

4.7 Parâmetros hematológicos e níveis séricos de cortisol

Valores de hematócrito (%) foram maiores em fêmeas do T3 ($32,29 \pm 2,26$), quando comparados com as do T1 ($24,54 \pm 1,32$) ($p = 0,0245$), bem como maiores em machos do T3 ($34,43 \pm 1,59$), quando comparados com os machos do T2 ($25,17 \pm 1,85$) ($p = 0,0188$) (Tabelas 4 e 5). Menores valores de glicose foram encontrados em fêmeas e machos do T1 ($12,72 \pm 2,37$; $p = 0,0027$ e $9,93 \pm 3,48$; $p = 0,001$, respectivamente) em relação a T2 e T3. Os valores de eritrócitos e leucócitos aumentaram com o aquecimento da água em fêmeas, sendo encontrados os maiores valores no T3 ($1,80 \pm 0,26 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ e $450,67 \pm 105,45 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente) e T2 ($1,50 \pm 0,25 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ e $367,5 \pm 58,43 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente) ($p = 0,0029$ e $p = 0,0066$, respectivamente). Em machos os valores de eritrócitos mostraram a mesma tendência com maiores valores no T3 ($1,49 \pm 0,24 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) e T2 ($1,50 \pm 0,12 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) ($p = 0,0095$), porém não houve diferenças significativas em relações aos valores de leucócitos entre os tempos de amostragem. As concentrações séricas de cortisol foram maiores em fêmeas do T2 ($12,50 \pm 3,78$), quando comparadas com as fêmeas do T3 ($1,50 \pm 1,00$) ($p = 0,0192$), em machos não houve diferenças significativas entre os tempos de amostragem. Os valores de proteína plasmática total (PPT) não apresentaram diferenças significativas entre os tempos de amostragem em ambos os gêneros (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Variáveis hematológicas, bioquímica sanguínea e níveis séricos de cortisol em fêmeas de *L. alexandri* sob condições de cultivo.

	T1	T2	T3
Hematócrito (%)	24,54 ± 1,32 ^b	29,13 ± 1,59 ^{ab}	32,29 ± 2,26 ^a
PPT (g/dL)	3,82 ± 0,48 ^a	2,35 ± 0,15 ^a	2,50 ± 0,24 ^a
Eritrócitos (x 10 ⁶ µL ⁻¹)	0,70 ± 0,09 ^b	1,50 ± 0,25 ^a	1,80 ± 0,26 ^a
Leucócitos (x 10 ³ µL ⁻¹)	159,37 ± 16,40 ^b	367,5 ± 58,43 ^a	450,67 ± 105,45 ^a
Glicose (mg/dL)	12,72 ± 2,37 ^b	41,86 ± 8,61 ^a	35,57 ± 9,77 ^a
Cortisol (ng/mL)	2,54 ± 1,71 ^{ab}	12,50 ± 3,78 ^a	1,50 ± 1,00 ^b

Dados são expressos como média ± EP. Amostragem dos peixes: (T1) dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; (T2) 20 a 40 dias a 27°C e (T3) 70 dias a 27°C. (PPT) proteína plasmática total. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta, $p < 0,05$.

Tabela 5. Variáveis hematológicas, bioquímica sanguínea e níveis séricos de cortisol em machos de *L. alexandri* sob condições de cultivo.

	T1	T2	T3
Hematócrito (%)	30,63 ± 6,33 ^{ab}	25,17 ± 1,85 ^b	34,43 ± 1,59 ^a
PPT (g/dL)	3,26 ± 0,66 ^a	1,87 ± 0,21 ^a	2,59 ± 0,17 ^a
Eritrócitos (x 10 ⁶ µL ⁻¹)	0,80 ± 0,15 ^b	1,50 ± 0,12 ^a	1,49 ± 0,24 ^a
Leucócitos (x 10 ³ µL ⁻¹)	186,5 ± 27,64 ^a	321,67 ± 77,06 ^a	250 ± 64,44 ^a
Glicose (mg/dL)	9,93 ± 3,48 ^b	67,70 ± 9,99 ^a	57 ± 15,73 ^a
Cortisol (ng/mL)	17,18 ± 11,60 ^a	17,96 ± 4,26 ^a	21,06 ± 4,04 ^a

Dados são expressos como média ± EP. Amostragem dos peixes: (T1) dia 0, peixes mantidos em água a 23°C; (T2) 20 a 40 dias a 27°C e (T3) 70 dias a 27°C. (PPT) proteína plasmática total. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O controle da função reprodutiva em cativeiro é essencial para a sustentabilidade da piscicultura comercial e o estudo da gametogênese e maturação gonadal fornece informações importantes que podem ser aplicadas na manipulação da reprodução, visando o aumento da produção de ovos, larvas e juvenis (Bhujel, 2000; Lubzens et al., 2010; Mylonas et al., 2010). A atividade reprodutiva de peixes é regulada por complexos mecanismos neuroendócrinos sob influência de muitas variáveis ambientais. No caso de espécies de peixes que reproduzem naturalmente em cativeiro, esse controle é feito através da manipulação de fatores abióticos e bióticos (Bhujel, 2000). A temperatura e o fotoperíodo figuram entre os fatores abióticos mais importantes na manipulação da reprodução em cativeiro, porém a disponibilidade de alimento, qualidade da água, ambiente social e substratos adequados para a desova, também podem ser decisivos (Bonga, 1997).

No presente estudo, os efeitos do aumento da temperatura (27°C) sobre a atividade reprodutiva de *L. alexandri* em cativeiro foram mais pronunciados nas fêmeas do que nos machos. Assim, 70 dias após aquecimento da água (T3) foi encontrada a maior frequência de fêmeas em maturação avançada e maduras, coincidindo com um aumento marcante do IGS, e proporção dos folículos vitelogênicos com correspondente aumento nos diâmetro e altura das células foliculares. Por outro lado, exposição a baixas temperaturas (23°C) resultou em significativa regressão da atividade gonadal nas fêmeas. No T1, os ovários continham grande proporção de folículos perinucleolares em relação a outros tipos de folículos, além do alto índice de atresia folicular encontrado a 23°C. De modo similar, alto índice de atresia folicular foi também reportado quando *Colossoma macropomum* foi cultivado em baixas temperaturas de água (Araújo-Lima & Gomes, 2005), e em outras espécies como *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus lineatus* amostradas imediatamente a jusante de barragens hidrelétricas, onde existem condições térmicas instáveis (Arantes et al., 2010; Perini et al., 2013).

Ovários e testículos do pacamã, *L. alexandri*, possuem o mesmo padrão e relações anatômicas básicas encontradas para a maioria dos Siluriformes (Bazzoli, 2003). As características morfológicas das gônadas em condições de cultivo são similares às descritas previamente para a espécie (Barros et al., 2007; Melo et al., 2011a).

Pequenas vesículas corticais foram visualizadas formando uma camada contínua em ovócitos pré-vitelogênicos de *L. alexandri*, estando mais visíveis em ovócitos vitelogênicos iniciais, e reagiram positivamente à técnica de AB pH 2,5, indicando a presença de polissacarídeos ácidos. À microscopia eletrônica de transmissão, elas são identificadas como grânulos elétron-lúcidos limitados por membrana. As vesículas corticais são ricas em polissacarídeos formando glicoproteínas e glicoconjugados, que são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi do ovócito em desenvolvimento (Bazzoli & Godinho, 1994). Essas macromoléculas são secretadas em resposta a fertilização e são liberadas no espaço perivitelínico, bloqueando a polispermia (Hart, 1990).

A zona radiata é um envoltório acelular complexo situado entre a superfície do ovócito e as células foliculares, que desempenha importantes papéis nos processos reprodutivos e do desenvolvimento (Hart, 1990; Arukwe & Goksøyr, 2003). A estrutura e as especializações da zona radiata variam entre as espécies e estão diretamente relacionadas a diferentes estratégias reprodutivas das espécies. Em *L. alexandri*, assim como descrito para outros teleósteos, a zona radiata apresenta poros-canais que são preenchidos por prolongamentos do ovócito e microvilos das células foliculares. Estes poros são formados durante a foliculogênese e permitem a troca de material do ovócito com o meio. A zona radiata completamente formada apresenta duas camadas, a interna que está diretamente em contato com a membrana plasmática do ovócito e a externa que forma a superfície do ovo após a desova (Rizzo et al., 2002). Apesar de *L. alexandri* possuir ovos demersais, que geralmente apresentam zona radiata espessa, sua natureza psamófila confere maior proteção aos seus ovos e, conseqüentemente apresenta zona radiata mais delgada do que ovos de outros Siluriformes que desovam em cascalho ou pedras e seus ovos estão sujeitos a maior dano físico e abrasão (Sato, 1999; Sato et al., 2003c; Barros et al., 2007).

No presente estudo, as células foliculares de *L. alexandri* reagiram positivamente à técnica de PAS e ao AB pH 2,5, indicando a presença de glicoproteínas. À microscopia eletrônica de transmissão, as células foliculares prismáticas altas apresentaram características de células secretoras, com retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, complexo de Golgi e citoplasma repleto de grânulos de secreção esféricos elétron-

densos. Estas células secretoras estão envolvidas na produção de mucosubstâncias que formam a cobertura (capa) gelatinosa do ovo, a qual é responsável pela adesividade do ovo do pacamã ao substrato após desova e que é também encontrada em ovos de outros Siluriformes (Rizzo & Godinho, 2003; Santos et al., 2006; Barros et al., 2007; Melo et al., 2011a; Martins et al., 2012; Melo et al., 2016a).

No T3, 70 dias após o aquecimento da água, os ovócitos vitelogênicos maduros e células foliculares circundantes atingiram medidas comparáveis a encontrados para pacamãs selvagens e outros Siluriformes relacionados, como *Harttia torrenticola*, espécie endêmica do rio São Francisco (Barros et al., 2007; Melo et al., 2011a; Melo et al., 2016a). Além disso, não foram detectadas diferenças morfológicas nos ovócitos vitelogênicos maduros entre as regiões cranial e caudal dos ovários. Analisando secções histológicas de ovários maduros de *L. alexandri* foram identificados folículos em diferentes fases da vitelogênese, folículos pré-vitelogênicos e perinucleolares. Ovários em regressão inicial apresentaram folículos pós-ovulatórios ao lado de folículos pré-vitelogênicos, perinucleolares e atrésicos. Esta distribuição é característica de espécies que possuem desenvolvimento assincrônico dos ovócitos e desova parcelada, quando os ovócitos são eliminados em lotes durante período prolongado de desova.

A fecundidade avalia o potencial reprodutivo de uma espécie através do número de ovócitos vitelogênicos presentes nos ovários antes de iniciar o período reprodutivo (Arantes et al., 2013). Destaca-se como um parâmetro importante, pois permite a realização de prognósticos reprodutivos e estabelecimento de critérios para exploração e manejo de espécies de importância comercial. No caso das espécies de desova parcelada, a fecundidade avalia especificamente o número de ovócitos liberados em cada lote (Rizzo & Bazzoli, 2014). Fêmeas de *L. alexandri* possuem baixa fecundidade absoluta, assim como descrito para outras espécies de Siluriformes com hábito sedentário (Santos et al., 2013). A média do número de ovócitos encontrada para fêmeas de *L. alexandri* em condições de cultivo (8.187,21) foi maior do que a reportada para fêmeas que passaram pelo processo de desova induzida (4.534) (Sato et al., 2003c). Isso está relacionado com o fato de que na desova induzida se obtém a fecundidade absoluta liberada, onde os folículos que não completaram corretamente a foliculogênese, principalmente os vitelogênicos e entraram em processo de atresia não são contabilizados. Espécies que possuem ovócitos pequenos comumente possuem

fecundidade alta devido à baixa sobrevivência dos juvenis. Em contrapartida, espécies com ovócitos de grande diâmetro como o pacamã, geralmente possuem padrão reprodutivo básico relacionado à estratégia de equilíbrio, caracterizada pela presença de cuidado parental, reprodução contínua com baixa fecundidade e alta sobrevivência dos juvenis (Winemiler, 1989; Melo et al., 2011b).

Após a maturação, os ovócitos são liberados das lamelas ovulíferas (ovulação) para serem posteriormente liberados no meio externo (desova). Fêmeas não desovadas desenvolvem intenso processo de atresia folicular, fenômeno degenerativo dos ovários que ocorre em condições naturais e experimentais, culminando com a reabsorção de ovócitos (Shanbhag & Saidapur, 1996; Sato et al., 2003a; Rizzo & Bazzoli, 2014). Alta frequência de atresia folicular provoca regressão do ovário, inviabilizando a desova dos peixes e reduzindo o potencial reprodutivo da espécie (Rizzo & Bazzoli, 1995). No presente estudo, observou-se que à temperatura de 23°C (T1) a ocorrência de ovários atrésicos é alta e como consequência, a maior parte dos ovários amostradas no T1 estavam em regressão. A partir do T2, com o aquecimento da água, fêmeas em processo de maturação gonadal superaram em número as que estavam em processo de regressão. A regressão dos ovários não desovados é um processo prolongado, o que explica que mesmo no T3, após 70 dias do início do aquecimento da água, existam fêmeas em regressão apresentando corpos amarelos nos ovários, semelhante às fêmeas de T1. Nesse sentido, fêmeas de *Astyanax bimaculatus* e *Leporinus reinhardti* mantidas em cativeiro e que não desovaram, apresentaram uma alta taxa de folículos atrésicos, culminando em um longo processo de reabsorção folicular, com 7 e 4 meses, respectivamente (Miranda et al., 1999). Trabalho realizado com manejo de reprodutores e matrizes de *L. alexandri* para propagação de alevinos na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA) demonstrou que *L. alexandri* desova durante todo o ano, porém o maior número de desovas ocorreu na temperatura média de 28°C, contrastando com os meses mais frios em que as desovas foram sempre menores (Lopes, 2013). A reprodução natural de pacamãs silvestres devidamente adaptados e mantidos em cativeiro foi realizada recentemente sob condições controladas, onde a manipulação da temperatura da água foi fundamental (temperatura elevada a 28°C) (Costa et al., 2015). Outros estudos em condições experimentais também relacionam a importância do efeito do aumento da temperatura para o desenvolvimento gonadal e desova (Tveiten & Johnsen, 1999; Hilder & Pankhurst 2003; Okumura et al., 2003; Utoh et al., 2013),

reforçando a importância desse parâmetro em peixes neotropicais e principalmente em condições de cultivo. Deste modo, a temperatura da água deve ser considerada de acordo com a espécie de peixe a ser cultivada (Garcia et al., 2008).

Os testículos de *L. alexandri* são do tipo tubular anostomosado, onde túbulos seminíferos ramificados se interconectam, conduzindo os espermatozoides até os ductos espermáticos (Parenti e Grier, 2004), com distribuição irrestrita das espermatogônias. Este padrão é detectado em várias espécies de peixes neotropicais (Andrade et al., 2001; Santos et al., 2001; Lopes et al., 2004; Magalhães et al., 2004; Carvalho et al., 2009; Melo et al., 2016b). Os testículos de Siluriformes geralmente apresentam projeções digitiformes ou franjas em toda a sua extensão, que ficam mais evidentes na estação reprodutiva. Testículos franjados, assim como os de *L. alexandri* (Melo et al., 2011a) também foram descritos para *Pimelodus maculatus* (Bazzoli et al., 1997) e *Iheringichthys labrosus* (Santos et al., 2001). No presente estudo, foi observada a presença de túbulos revestidos por células com características secretoras na região das franjas caudais de testículos em maturação, com lúmen apresentando quantidade variada de espermatozoides que, pela localização, provavelmente estavam sendo conduzidos até o ducto espermático. A vesícula seminal é ausente no sistema reprodutor de machos de pacamã, no entanto secreção homogênea acidófila associada à espermatozoides é encontrada na região caudal dos testículos durante o período reprodutivo e imediatamente após a espermição, período em que as células do epitélio dos túbulos da região caudal apresentam atividade secretora (Barros et al., 2007; Melo et al., 2011a). Esta secreção pode estar relacionada àquelas das vesículas seminais, executando papel importante na maturação do espermatozoide e nutrição (Mazzoldi et al., 2005).

A gametogênese e maturação gonadal são reguladas pelas gonadotrofinas pituitárias (FSH e LH) e hormônios esteroides sexuais (17β -estradiol, Testosterona e 11-ketotestosterona) sob influência de fatores ambientais como a temperatura da água (Arantes et al., 2011; Okuzawa & Gen, 2013). A alta frequência de fêmeas de *L. alexandri* em maturação no T3 é suportada pelo aumento significativo dos níveis séricos de 17β -E que elevaram consideravelmente em resposta ao aumento da temperatura da água a 27°C. Isto se deve ao papel deste hormônio no processo reprodutivo de fêmeas, relacionado à indução e síntese das proteínas do ovo, Zrps e Vtg no fígado (Van Bohemen et al., 1982; Tyler & Sumpter, 1996; Shimizu, 2003; Biswas et al., 2005). No

presente estudo, foram observados maiores níveis hepáticos de Vtg em fêmeas do T3, em resposta ao aumento de 17β -E enquanto níveis de Zrps foram mais baixos nesse período, possivelmente porque a expressão das Zrps precede a de Vtg. Na maioria das espécies de teleósteos, a zonagênese começa no início do crescimento ovocitário, finalizando na fase vitelogênica e baixos níveis de 17β -E são suficientes para estimular a formação de Zrps no fígado (Baldisserotto, 2013). Baixos níveis séricos de 17β -E em fêmeas do T1 (água a 23°C) justificam os menores valores de IGS, bem como os menores diâmetros de folículos vitelogênicos. Resultados similares foram encontrados para fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) sob condições experimentais, onde houve aumento das concentrações plasmáticas de 17β -E de forma sincrônica com o aumento da temperatura (Barcellos et al., 2001) e em fêmeas de curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*) submetidas a desova induzida. Neste caso, a elevação das concentrações de 17β -E em fêmeas de curimatã-pacu expostas à temperatura de água mais elevada (26°C) foi responsável pelo aumento do diâmetro dos ovócitos vitelogênicos, diferentemente de fêmeas expostas a baixa temperatura (23°C), onde o número de ovócitos vitelogênicos foi significativamente menor (Arantes et al., 2011).

A resposta do hormônio 11-KT ao aumento da temperatura em machos de pacamã ocorreu de forma mais rápida (T2) do que a de 17β -E em fêmeas (T3). A 11-KT é o andrógeno predominante na circulação da maioria de machos de peixes teleósteos e estimula a maturação testicular, atuando na diferenciação das espermatogônias, formação de cistos de espermatócitos e liberação de espermatozoides no lúmen tubular. Os andrógenos (T e 11-KT) tendem a aumentar gradualmente durante a espermatogênese e diminuir na espermição (Schulz et al. 2010). Apesar de ter ocorrido um aumento significativo dos níveis séricos de 11-KT a partir do aquecimento da água a 27°C , as variações histológicas observadas nos testículos de machos de *L. alexandri* durante o experimento foram discretas. Todos os machos apresentaram testículos nos estádios de maturação ou maduros, com a presença de grande volume de espermatozoides nos ductos espermáticos, o que também é evidenciado pelos valores próximos do IGS durante os três tempos de amostragem. Estes resultados indicam que a espermatogênese de *L. alexandri* em condições de cultivo é menos sensível ao aumento da temperatura de 23 a 27°C do que as fêmeas. Na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), existe um balanço entre auto-renovação e diferenciação espermatogonial em temperatura fisiológica (25°C). Entretanto, em baixas temperaturas (20 - 21°C) há o

favorecimento da auto-renovação e, em contrapartida, a diferenciação e maturação dos testículos são favorecidas a altas temperaturas (35°C), resultando em grande produção de espermatozoides (Alvarenga e França, 2009; Melo et al., 2016b). Em um estudo com machos juvenis de jundiá (*R. quelen*) as concentrações de 11-KT durante o primeiro ciclo reprodutivo foram extremamente altas, sugerindo que este andrógeno desempenha um papel mais importante durante a fase puberal desta espécie (Barcellos, et al., 2002).

Níveis hepáticos de Vtg e Zrps para machos de *L. alexandri* foram similares aos das fêmeas, corroborando com os achados histológicos de gônadas intersexo no presente estudo e em estudos prévios realizados com a mesma espécie também em condições de cativeiro, onde foram identificados indivíduos intersexo (Melillo Filho et al., 2016). Esta condição em machos, usualmente forma ovotestis, caracterizado por feminilização parcial em que os folículos perinucleolares, pré-vitelogênicos e vitelogênicos podem aparecer em testículos macroscopicamente caracterizados como normais (Arukwe & Goksøyr, 2003). Níveis plasmáticos de Vtg e Zrps encontrados no sangue de machos geralmente são muito baixos ou inexistentes, porém a síntese destas proteínas pode ser induzida em machos expostos a desreguladores endócrinos (Prado et al., 2011). No caso de peixes em condições de cultivo, onde todos os parâmetros físico-químicos são fortemente monitorados, esta condição pode estar relacionada ao processo natural de excreção hormonal dos peixes. Sabe-se que peixes excretam esteroides livres e conjugados, especialmente antes e durante períodos reprodutivos (Kolodziej et al., 2004), indicando que a renovação da água dos tanques deve ser reavaliada, mesmo que a princípio a presença destes folículos vitelogênicos em testículos de *L. alexandri*, tenha sido notada em pequenos grupos não afetando, aparentemente, a espermatogênese e maturação testicular. Por outro lado, a presença de desreguladores endócrinos durante o cultivo do pacamã assim como a qualidade do esperma do dessa espécie em cativeiro devem ser investigados.

Contrastando com as elevações séricas de 17 β -E em fêmeas e 11-KT em machos em resposta ao aumento da temperatura da água, as concentrações de 17 α -OHP em fêmeas não apresentaram variações bruscas durante o experimento. O esteroide 17 α -OHP é precursor do DHP, responsável pelos eventos da maturação final ovocitária (Nagahama, 1994). Após o início do experimento, com o aquecimento da água houve um discreto aumento das concentrações de 17 α -OHP entre os tempos de amostragem T2

e T3. Esse aumento parece ter sido suficiente para promover o início da maturação final ovocitária em fêmeas, pois somente no T3 foram encontrados folículos vitelogênicos com núcleos excêntricos. Concentrações similares de 17α -OHP em fêmeas do T1 e T3, podem ser um indício da existência de ovulação nas fêmeas do T1, mesmo em água a 23°C . Além disso, sugerem que as concentrações séricas crescentes de 17β -E em fêmeas de *L. alexandri* pode ser uma estratégia da espécie para manter a produção de lotes de ovócitos, com curto intervalo de tempo (latência) entre as desovas.

Os eventos da desova em peixes geralmente estão correlacionados a picos de 17α -OHP (Barcellos, 2001; Perini et al., 2013), porém, nos peixes com desenvolvimento ovariano assincrônico, as gonadotrofinas são liberadas continuamente, e os níveis plasmáticos de esteroides maturacionais são baixos e com poucas mudanças ao longo dos ciclos gonadais (Baldisserotto, 2013). No presente estudo, apesar de ter sido detectada a maturação final ovocitária, nenhuma desova foi encontrada no fundo dos tanques. Também não foi reportada desova para os casais em tanque com substrato arenoso. Pacamãs silvestres em condições de cultivo desovaram em substrato de areia com no mínimo 24 e máximo 60 dias após o aquecimento da água (Costa et al., 2015). Entretanto, levando-se em conta o processo de regressão ovariana que as fêmeas de *L. alexandri* do presente estudo foram submetidas quando mantidas em água a 23°C , caracterizado histologicamente principalmente no T1, e que o processo de reabsorção folicular pode durar meses, o tempo entre o aquecimento da água e desova pode ser variável.

Os peixes estão constantemente sujeitos a alterações dos meios externo e interno, contra os quais disparam respostas compensatórias e adaptativas que ajustam as condições corporais para manter a homeostase (Urbinati et al., 2014). Peixes sob condições de cultivo podem enfrentar além das alterações ambientais regulares, condições inesperadas, como procedimentos rotineiros de manejo, alterações na composição do meio aquático, densidade de estocagem, estabelecimento de hierarquias sociais, dentre outros, que podem colocar em risco a saúde, bem-estar e sobrevivência (Urbinati et al., 2014).

No presente estudo apesar de não existir diferenças significativas nos níveis séricos de cortisol em machos de *L. alexandri* entre os tempos amostrados, fêmeas do T2

apresentaram níveis relativamente maiores em relação às fêmeas do T3. Após a elevação da temperatura da água houve aumento significativo nos níveis de glicose sanguínea e quantidade de eritrócitos presentes no sangue tanto em fêmeas quanto em machos. Mudanças nos níveis séricos de cortisol e glicose são as respostas fisiológicas mais utilizadas como indicadores de estresse em peixes (Martínez-Porchas et al., 2009; Ellis et al., 2012).

Durante o experimento, a temperatura da água foi elevada de 23 a 27°C e todos os outros parâmetros do cultivo foram estritamente controlados, incluindo a padronização da coleta sanguínea. Porém, não se descarta a possibilidade de que a resposta inicial dos peixes em relação aos parâmetros sanguíneos obtidos tenha sido influenciada pela captura, manuseio e aumento da densidade, já que os peixes foram transferidos de um tanque com capacidade de 10.000 L para um tanque menor, com capacidade de 3.000 L. Esta possível interferência também foi ponderada em outros trabalhos com características semelhantes (Okuzawa & Gen, 2013). Entretanto, níveis consideravelmente mais elevados de cortisol e de variáveis hematológicas e bioquímicas, são necessários para expressar os efeitos do estresse sobre a reprodução e concentrações de esteroides sexuais, do que os observados neste estudo para *L. alexandri* (Pickering & Pottinger, 1989; Pankhurst & Sharples, 1992; Ruane et al., 2002; Bernier et al., 2008; Dobšíková et al., 2009). Do mesmo modo, alguns fatores como a temperatura da água e aumento dos níveis de glicose podem não ser considerados estressores diretos, uma vez que estão diretamente relacionados a alterações metabólicas que desencadeiam um mecanismo de adaptação ou aclimação. O aumento da temperatura da água causa alterações no metabolismo dos peixes que levam também, a um incremento dos batimentos cardíacos e respiração (Martínez-Porchas et al., 2009; Sadati et al., 2011; Costa et al., 2016).

Levando em consideração os resultados das análises dos parâmetros sanguíneos, reprodutivos e fisiológicos, é plausível sugerir que o aumento da temperatura e as condições de cultivo não promoveram resposta significativa de estresse, e forneceram condições necessárias e adequadas para a gametogênese e maturação gonadal que, em cativeiro, podem ser induzidas através do aumento da temperatura da água a 27°C.

Apesar da ausência de desova, as fêmeas de *L. alexandri* mantidas em cultivo atingiram maturação final ovocitária e alguns folículos pós-ovulatórios foram observados em cortes histológicos, indicando a ocorrência de ovulação. De acordo com Mylonas et al. (2010), este é o tipo mais simples de disfunção reprodutiva observada em peixes cultivados, como ocorre em salmonídeos e que pode ser relacionada à perda de comportamento de desova causada pela domesticação ou ausência de substrato apropriado de desova. Nos machos, a disfunção mais comumente observada é a redução da produção espermática e da qualidade do esperma, características que não foram avaliadas nos pacamãs do presente estudo. No entanto, Costa e colaboradores (2015) manipulando o período reprodutivo de pacamãs selvagens adaptados às condições de cativeiro, através do controle da temperatura, alimentação baseada em filés de tilápia congelados e tanques com substrato arenoso, obtiveram desovas poucos dias após o aumento da temperatura da água a 28°C. Tais fatos indicam a relevância do aspecto nutricional e a importância de mais estudos nesse sentido.

6. CONCLUSÕES

- A manutenção das fêmeas de *Lophiosilurus alexandri* em água a 23°C promove atresia folicular e regressão ovariana, que podem comprometer o potencial reprodutivo desta espécie em condições de cultivo;
- A elevação da temperatura da água a 27°C proporciona o desenvolvimento ovariano, com elevação dos níveis de esteroides sexuais, culminando com a maturação final ovocitária;
- Em machos, espermatogênese e maturação testicular são menos sensíveis ao aumento de temperatura da água entre 23 e 27°C;
- Níveis hepáticos de Vtg e Zrps em machos, similares ao das fêmeas e a presença de peixes intersexo, são evidências de desregulação endócrina em cativeiro;
- Variáveis hematológicas e bioquímicas podem ser bons indicadores biológicos para o monitoramento da condição de saúde dos peixes em ambiente de cultivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarenga, É. R.; 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): 537-544.
- Andrade, R. F.; Bazzoli, N.; Rizzo, E.; Sato, Y., (2001). Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tissue and Cell*, 33(5): 524-532.
- Andrade, D. R.; Yasui, G. S., (2003). Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27(2): 166-172.
- Arantes, F. P.; Santos, H. B.; Rizzo, E.; Sato, Y.; Bazzoli, N., (2010). Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Animal Reproduction Science*, 118(2): 330-336.
- Arantes, F. P.; Santos, H. B.; Rizzo, E.; Sato, Y.; Bazzoli, N., (2011). Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimatã-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). *General and Comparative Endocrinology*, 172(3): 400-408.
- Arantes, F. P.; Sato, Y.; Sampaio, E. V.; Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2013). Spawning induction and fecundity of commercial native fish species from the São Francisco River basin, Brazil, under hatchery conditions. *Agricultural Sciences*, 4 (8): 382-388.
- Araújo-Lima, C. A. R. M.; Gomes L. C., (2005). Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Pp. 175-193. In: Baldissotto, B. & L. C. Gomes. (Eds.). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Santa Maria, UFSM, 470p.

- Arukwe, A.; Goksøyr, A., (2003). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology*, 2(1): 4.
- Ávila, F., (2006). *Guia ilustrado de peixes do rio São Francisco de Minas Gerais: curiosidades, características físicas e de comportamento de 22 espécies de peixes*. São Paulo: Empresa das Artes. 118p.
- Baldisserotto, B., (2013). Reprodução. Pp.181-230. In: *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: UFSM, 350p.
- Barcellos, L. J. G.; Kreutz, L.C.; Souza, C.; Rodrigues, L.B.; Fioreze, I.; Quevedo, R.M.; Cericato, L.; Soso, A.B.; Fagundes, M.; Conrad, J.; Lacerda, L.A.; Terra, S., (2004). Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, 237: 229-236.
- Barcellos, L. J. G.; Wassermann, G. F.; Scott, A. P.; Woehl, V. M.; Quevedo, R. M., Itzés, I.; Lulhier, F., (2001). Steroid profiles in cultured female jundia, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 121(3): 325-332.
- Barcellos, L. J. G.; Wassermann, G. F.; Scott, A. P.; Woehl, V. M.; Quevedo, R. M., Itzés, I.; Lulhier, F., (2002). Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology*, 61(3): 751-763.
- Barros, M. D.; Guimarães-Cruz, R. J.; Veloso-Júnior, V. C.; Santos, J. E. D., (2007). Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(1): 213-221.

- Barton, B. A.; Iwama, G., (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3–26.
- Bazzoli, N., (2003). Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. Pp. 291-306. In: Godinho, H. P.; Godinho, A. L. (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p.
- Bazzoli, N.; Cangussu, L. C. V.; Rizzo, E.; Santos, G. B., (1997). Reprodução e desova de mandis *Pimelodus maculatus* e *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) nos reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. *Bios*, 5(5): 7-15.
- Bazzoli, N.; Godinho, H. P., (1994). Cortical alveoli in oocytes of freshwater neotropical teleost fish. *Bolletino di Zoologia*, 61(4): 301-308.
- Bernier, N. J.; Alderman, S. L.; Bristow, E. N., (2008). Heads or tails? Stressor-specific expression of corticotropin-releasing factor and urotensin I in the preoptic area and caudal neurosecretory system of rainbow trout. *Journal of Endocrinology*, 196(3): 637-648.
- Bhujel, R. C., (2000). A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hap-based systems. *Aquaculture*, 181(1): 37-59.
- Biswas, A. K.; Morita, T.; Yoshizaki, G.; Maita, M.; Takeuchi, T., (2005). Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. *Aquaculture*, 243(1): 229-239.
- Bonga, S. W., (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3): 591-625.
- Brasil (2013). Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília, DF.

- Brasil (2017). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Aquicultura. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/pesca-e-aquicultura/aquicultura>. Acesso em: 12 mar. 2017.
- Britski, H. A.; Sato, Y.; Rosa, A. B. S., (1986). *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco*. 2a ed. Brasília: CODEVASF, 115 p.
- Cardoso, E. L.; Chiarini-Garcia, H.; Ferreira, R. M. A.; Poli, C. R., (1996). Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to unionized ammonia. *Journal of Fish Biology*, 49(5): 778-787.
- Carvalho, P. A.; Paschoalini, A. L.; Santos, G. B.; Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2009). Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 25(3): 306-313.
- Chaves-Pozo, E.; Liarte, S.; Vargas-Chacoff, L.; García-López, A.; Mulero, V.; Meseguer, J.; Mancera, J. M.; García-Ayala, A., (2007) 17Beta-estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males. *Biological Reproduction*, 76: 142-148.
- Cielo, G., (2000) Jundiá Cinza: Como um bom bagre cresce bem e encanta piscicultores do Sul. *Panorama da Aquicultura*, 10(58): 14-19.
- Costa, D. C.; e Silva, W. D. S.; Melillo Filho, R.; Miranda Filho, K. C.; dos Santos, J. C. E.; Luz, R. K., (2015). Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. *Animal Reproduction Science*, 159: 148-154.
- Costa, D. P.; Leme, F. O. P.; Takata, R.; Costa, D. C.; e Silva, W. D. S; Melillo Filho, R.; Alves, G. M; Luz, R. K., (2016). Effects of temperature on growth, survival and physiological parameters in juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. *Aquaculture Research*, 47(6): 1706-1715.

- Dias, M. T. D.; Ishikawa, M. M.; Martins, M. L.; Satake, F.; Hisano, H.; de Pádua, S. B.; Sant'ana, A. R., (2009). Pp 35. Hematologia: ferramenta para o monitoramento de estado de saúde de peixes em cultivo. In: Saran N., A.; Mariano, W. dos S.; Sória, S. F. P. (Org.). *Tópicos especiais em saúde e criação animal* São Carlos: Pedro & João Editores.
- Dobšíková, R.; Svobodova, Z.; Blahova, J.; Modra, H.; Velíšek, J., (2009). The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Czech Journal Animal Science*, 54(11): 510-518.
- 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 Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 287(2): 176-182.
- Ellis, T.; Yildiz, H. Y.; López-Olmeda, J.; Spedicato, M. T.; Tort, L.; Øverli, Ø.; Martins, C. I., (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1): 163-188.
- FAO (2007). Database on Introductions of Aquatic species. Disponível em: http://www.fao.org/fi/website/SwapLang.do?language=en&page=%2FFIRetrieveAction.do%3Fdom%3Dcollection%26xml%3Ddias.xml%26xp_nav%3D1 Acesso em: 10 ago. 2015.
- FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 p.
- Freitas, L. J.; Prado, P. S.; Arantes, F. P.; Santiago, K. B.; Sato, Y.; Bazzoli, N.; Rizzo, E., (2013). Reproductive biology of the characid dourado *Salminus franciscanus* from the São Francisco River, Brasil. *Animal Reproduction Science*, 139(1): 145-154.

- Garcia, L. D. O.; Copatti, C. E.; Wachholz, F.; Pereira Filho, W.; Baldisserotto, B., (2008). Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication for fish culture. *Neotropical Ichthyology*, 6(2): 275-281.
- Gazola, R.; Borella, M. I., (1997). Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30(12): 1485-1487.
- Godinho, A. L.; Godinho, H. P., (2003). Breve visão do São Francisco, p. 15-24. In: Godinho, H. P.; Godinho, A. L. (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p.
- Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, E.; Brosius, E., (1971). Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal of Clinical Pathology*, 56: 35-39.
- Grier, H. J.; Uribe, M. C.; Parenti, L. R., (2007). Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). *Journal of Morphology*, 268(4): 293-310.
- Guimarães-Cruz, R. J.; Veloso-Júnior, V. C.; Sales, N. G.; Oliveira, D. A. A.; Santos, J. E., (2014). Allometric growth patterns in hatchery-reared larvae of the catfish *Lophiosilurus alexandri* (Pisces: Pseudopimelodidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(1): 284-288.
- Guraya, S. S., (1986). The cell and molecular biology of fish oogenesis, p.111-147. In: H. W. SAUER (Ed.). *Monographs in developmental biology*. Basel: *Karger Medical and Scientific Publishers*, v. 18, 223p.
- Hart, N. H., (1990). Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *International Review of Cytology*, 121: 1-66.

- Hilder, M. L.; Pankhurst, N. W., (2003). Evidence that temperature change cues reproductive development in the spiny damselfish, *Acanthochromis polyacanthus*. *Environmental Biology of Fishes*, 66(2): 187-196.
- Ihering, R. V.; Azevedo, P., (1934). A curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). *Arquivos do Instituto Biológico*, 5: 143-184.
- Iwama, G. K.; Vijayan, M. M.; Forsyth, R. B.; Ackerman, P. A., (1999). Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, 39: 901-909.
- Jain, N.C., (1986). *Schalm's veterinary hematology*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1221p.
- Kime, D. E.; Nash, J. P.; Scott, A. P., (1999). Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, 177(1): 345-352.
- Kitagawa, A. T.; Costa, L. S.; Paulino, R. R.; Luz, R. K.; Rosa, P. V.; Guerra-Santos, B.; Fortes-Silva, R., (2015). Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*). *Applied Animal Behaviour Science*, 171: 211-218.
- Kolodziej, E. P.; Harter, T.; Sedlak, D. L., (2004). Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, 38(23): 6377-6384.
- Kubitza, F., (2013). Nutrição e saúde no cultivo de tilápias. *Panorama da Aquicultura*, 21: 14-23.
- Kumakura, N.; Okuzawa, K.; Gen, K.; Kagawa, H., (2003). Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*). *General Comparative Endocrinology*, 131:264–273.

- Lopes, D. C. J. R.; Bazzoli, N.; Brito, M. F. G.; Maria, T. A., (2004). Male reproductive system in the South American catfish *Conorhynchus conirostris*. *Journal of Fish Biology*, 64(5): 1419-1424.
- Lopes, J. P.; França, F. L.; Santos Neto, M. A., (2013). O domínio na produção de alevinos de pacamã—Propagação na Chesf permite repovoamento no rio São Francisco. *Panorama da Aquicultura*, 23: 24-29.
- 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.; Cordeiro, N. I. S.; Filho, R. M.; Ikeda, A. L.; Rodrigues, L. A.; Santos, A. E. H.; Santos, J. C. E.; Silva, W.; Takata, R., (2011). Adaptação e reprodução de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) em condições de laboratório. *Panorama da Aquicultura*, 21(127): 54-57.
- Luz, R. K.; Santos, J. C. E., (2008a). Avaliação da tolerância de larvas do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (Pisces: Siluriformes) a diferentes salinidades. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 30(4): 345-350.
- Luz, R. K.; Santos, J. C. E., (2008b). Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(7): 903-909.
- Luz, R. K.; Santos, J. C. E.; Pedreira, M. M.; Teixeira, E. A., (2011). Effect of water flow rate and feed training on "pacamã" (Siluriforme: Pseudopimelodidae) juvenile production. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(4): 73-979.
- Magalhães, A. L.; Bazzoli, N.; Santos, G. B.; Rizzo, E., (2004). Reproduction of the South American dogfish characid, *Galeocharax knerii*, in two reservoirs from upper Paraná river basin, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 70(4): 415-425.
- Martínez-Porchas, M.; Martínez-Córdova, L. R.; Ramos-Enriquez, R., (2009). Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(2): 158-178.

- Martins, Y.S.; Arantes, F. P.; Sato, Y.; Santos, J. E.; Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2012). Comparative analysis of gonadal morphology in six fish species of the Incertae Sedis genera in Characidae of occurrence in the São Francisco River Basin, Brazil. *Acta Zoologica (Stockholm)* 93: 48–56.
- Martins, Y. S.; Melo, R. M. C.; Campos-Junior, P. H. A.; Santos, J. C. E.; Luz, R. K.; Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2014). Salinity and temperature variations reflecting on cellular PCNA, IGF-I and II expressions, body growth and muscle cellularity of a freshwater fish larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 202: 50-58.
- Mazzoldi, C.; Petersen, C. W.; Rasotto, M. B., (2005). The influence of mating system on seminal vesicle variability among gobies (Teleostei, Gobiidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43(4): 307-314.
- Melillo Filho, R.; Gheller, V. A.; Chaves, G. V.; Silva, W. S.; Costa, D. C., Figueiredo, L. G.; Julio, G. S. C.; Luz, R. K., (2016). Early sexing techniques in *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876), a freshwater carnivorous catfish. *Theriogenology*, 86(6): 1523-1529.
- Melillo Filho, R.; Takata, R.; Santos, A. E. H.; Souza e Silva, W.; Ikeda, A. L.; Rodrigues, L. A.; Luz, R. K., (2014). Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish. *Aquaculture Research*, 45(12): 1913-1920.
- Melo, R. M. C.; Arantes, F. P.; Sato, Y.; dos Santos, J. E.; Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2011a). Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). *Journal of Morphology*, 272(5): 525-535.
- Melo, R. M. C.; Ferreira, C. M.; Luz, R. K.; Sato, Y.; Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2011b). Comparative oocyte morphology and fecundity of five characid species from São Francisco River basin, Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(6): 1332-1336.

- Melo, R. M. C.; Gomes, D. D.; Moreira, D. P.; Gomes, M. R.; Bazzoli, N.; Rizzo, E., (2016a). Comparative morphology of the reproductive system of seven species of ostariophysan fishes from the upper Das Velhas River, Brazil. *Journal of Morphology*, 278: 170-181.
- Melo, R. M.; Martins, Y. S.; Luz, R. K.; Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2015). PCNA and apoptosis during post-spawning ovarian remodeling in the teleost *Oreochromis niloticus*. *Tissue and Cell*, 47(6): 541-549.
- Melo, R. M. C.; Ribeiro, Y. M.; Luz, R. K.; Bazzoli, N.; Rizzo, E., (2016b). Influence of low temperature on structure and dynamics of spermatogenesis during culture of *Oreochromis niloticus*. *Animal Reproduction Science*, 172, 148-156.
- Meurer, F.; Oliveira, S. T. L.; Dos Santos, L. D.; De Oliveira, J. S.; Colpini, L. M. S., (2010). Níveis de oferta de pós-larvas de tilápia do Nilo para alevinos de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 5(1): 111-116.
- Ministério do Meio Ambiente (2014). Portaria MMA nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos.
- Miranda, A. C. L.; Bazzoli, N.; Rizzo, E.; Sato, Y., (1999). Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue and Cell*, 31(5): 480-488.
- Miura T.; Higuchi M.; Ozaki Y.; Ohta T.; Miura C., (2006). Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 7333- 7338.
- Modig, C.; Westerlund, L.; Olsson, P. E., (2007). Oocyte zona pellucida proteins. In *The fish oocyte*. Pp. 113-139. *Netherlands: Springer*.

- Murzina, S. A.; Nefedova, Z. A.; Ruokolainen, T. R.; Vasil'eva, O. B.; Nemova, N. N., (2009). Dynamics of lipid content during early development of freshwater salmon *Salmo salar* L. *Russian Journal of Developmental Biology*, 40(3): 165-170.
- Murzina, S. A.; Ottesen, C. A. M.; Falk-Petersen, S.; Hop, H.; Nemova, N. N.; Poluektova, O. G., (2012). Oogenesis and lipids in gonad and liver of daubed shanny (*Leptoclinus maculatus*) females from Svalbard waters. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(5), 1393-1407.
- Mylonas, C. C.; Fostier, A.; Zanuy, S., (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3): 516-534.
- Nagahama, Y., (1983). The Functional Morphology of Teleost Gonads. *Fish physiology*, 9: 223-275.
- Nagahama, Y., (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*, 38: 217-217.
- Nagahama, Y.; Yamashita, M., (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development. Growth & Differentiation*, 50 (1): 195–219.
- Okumura, S.; Okamoto, K.; Oomori, R.; Sato, H.; Nakazono, A., (2003). Improved fertilization rates by using a large volume tank in red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4): 515-516.
- Okuzawa, K.; Gen, K., (2013). High water temperature impairs ovarian activity and gene expression in the brain–pituitary–gonadal axis in female red seabream during the spawning season. *General and Comparative Endocrinology*, 194: 24-30.
- Ostrensky, A.; Borghetti E, J. R.; Soto, D., (2007). Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil. *Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais*. Curitiba, 279 p.

- Pankhurst, N. W.; Sharples, D. F., (1992). Effects of capture and confinement on plasma cortisol concentrations in the snapper, *Pagrus auratus*. *Marine and Freshwater Research*, 43(2): 345-355.
- Parenti, L. R.; Grier, H. J., (2004). Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 44(5): 333-348.
- Patiño, R.; Sullivan, C. V., (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish physiology and Biochemistry*, 26(1): 57-70.
- Pedreira, M. M.; Luz, R. K.; dos-Santos, J. C. E.; Sampaio, E. V.; Silva, R. S. F., (2009). Biofiltração da água e tipos de substrato na larvicultura do pacamã. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(5): 511-518.
- Perini, V. R.; Paschoalini, A. L.; Cruz, C. K. F.; Rocha, R. C. G. A.; Senhorini, J. A.; Ribeiro, D. M.; Formagio, P. S., (2013) Profiles of sex steroids, fecundity and spawning of a migratory characiform fish from the Paraguay–Paraná basin: a comparative study in a three-river system. *Fish Physiology Biochemistry*, 39 (6): 1473-1484.
- Pickering, A. D.; Pottinger, T. G., (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1-6): 253-258.
- Prado, P. S.; Pinheiro, A. P. B.; Bazzoli, N.; Rizzo, E., (2014). Reproductive biomarkers responses induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American reservoir: an integrated field and laboratory approach. *Environmental Research*, 131: 165-173.
- Prado, P. S.; Souza, C. C.; Bazzoli, N.; Rizzo, E., (2011). Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(7): 1879-1887.

- Ranzani-Paiva, M. J. T.; de Pádua, S. B.; Tavares-Dias, M.; Egami, M. I., (2013). A hematologia clínica em peixes. Pp 14-18. In: *Métodos para análise hematológica em peixes*. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 140p.
- Rizzo, E.; Bazzoli, N., (1995) Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). *Revista Brasileira de Biologia*, 55(4): 697-703.
- Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2014). Reprodução e Embriogênese. Pp. 265-284. In: *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Edição: Bernardo Baldisserotto, José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati. Jaboticabal: FUNEP, 336p.
- Rizzo, E.; Godinho, H. P., (2003). Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes. Pp. 115-132. In: Godinho, H. P.; Godinho, A. L. (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p.
- Rizzo, E.; Sato, Y.; Barreto, B. P.; Godinho, H. P., (2002). Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 61 (3): 615–632.
- Reid S. G.; Bernier N. J.; Perry S. F., (1998) The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry Physiology C*, 120:1–27.
- Reid, S. G.; Vijayan, M. M.; Perry, S. F., (1996). Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Comparative Physiology B*, 165(8): 665-676.
- Ruane, N. M.; Carballo, E. C.; Komen, J., (2002). Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Aquaculture Research*, 33(10): 777-784.

- Sadati, M. A. Y.; Shakuriam, M.; Hasani, M. H.; Pourali, H. R.; Pourashadi, M.; Yousefi, A., (2011). Effects of daily temperature fluctuations on growth and hematology of juvenile *Acipenser baerii*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27: 591–594.
- Santos, J. E.; Bazzoli, N.; Rizzo, E.; Santos, G. B., (2001). Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue and Cell*, 33(5): 533-540.
- Santos, J. C. E.; Luz, R. K., (2009). Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. *Aquaculture*, 287(3): 324-328.
- Santos, J. E.; Padilha, G. E. V.; Bomcompagni-Júnior, O.; Santos, G. B.; Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2006). Ovarian follicle growth in the catfish *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue and Cell*, 38(5): 303-310.
- Santos, H. B.; Rizzo, E.; Bazzoli, N.; Sato, Y.; Moro, L., (2005). Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco basin. *Journal of Fish Biology*, 67(5): 1446-1459.
- Santos, H. B. D.; Sampaio, E. V.; Arantes, F. P.; Sato, Y., (2013). Induced spawning and reproductive variables of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 11(3): 607-614.
- Santos, H. B.; Thomé, R. G.; Arantes, F. P.; Sato, Y.; Bazzoli, N.; Rizzo, E., (2008). Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology*, 70(9): 1449-1460.

- Satake, F.; Pádua, S. B.; Ishikawa, M. M., (2009). Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. Pp. 330-345. In: Tavares-Dias, M. (Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Macapá.
- Sato, Y.; Bazzoli, N.; Rizzo, E.; Boschi, M. B.; Miranda, M. O. T.; Godinho, H. P.; Godinho, A. L., (2003a). Impacto a jusante do reservatório de Três Marias sobre a reprodução do peixe reofílico curimatá-pacu (*Prochilodus argenteus*). Pp. 327-346. In: Godinho, H. P.; Godinho, A. L. (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p.
- Sato, Y.; Fenerich-Verani, N.; Godinho, H. P., (2003b) Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. Pp. 275-289. In: Godinho, H. P.; Godinho, A. L. (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p.
- Sato, Y.; Fenerich-Verani, N.; Nuñez, A. P. O. ; Godinho, H. P. ; Verani, J. R., (2003c). Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco, Pp. 229-274. In: Godinho, H. P.; Godinho, A. L. (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p.
- Sato, Y.; Godinho, H.P., (1999) Peixes da bacia do rio São Francisco. In: Lowe-McConnell, R.H. Pp. 401-413. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo: Edusp, 534 p.
- Schulz, R. W.; de Franca, 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.
- Schulz, R. W.; Miura, T., (2002) Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish physiology and Biochemistry*, 26: 43-56.
- Selman, K.; Wallace, R. A., (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science*, 6(2): 211-231.

- Selye, H., (1985). The nature of stress. *Basal Facts*, 7(1): 3-11.
- Shanbhag, B.; Saidapur, S. K. (1996). Atretic follicles and corpora lutea in the ovaries of fishes: structure-function correlations and significance, p. 147-168. In: Munshi, J. S. D.; Dutta, M. H. M. (Ed.). *Fish Morphology—Horizons of New Research*. Rotterdam: AA Balkema: Brookfield, 300p.
- Shibatta, O. A., (2003). Pseudopimelodidae (Bumblebee catfishes, dwarf marbled catfishes), Pp. 401-405. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris JR, C. J. (Eds). *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, EDIPUCRS, 720p.
- Shimizu, A., (2003). Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 131(3): 310-324.
- Steindachner, F., (1876). Ichthyologische Beiträge (V). Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe* v. 74 (1. Abth.): 49-240, Pls. 1-15.
- Takata, R.; Costa, D. C.; Melillo Filho, R.; Luz, R. K., (2014). Effect of water temperature and prey concentrations on initial development of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae), a freshwater fish. *Neotropical Ichthyology*, 12(4): 853-859.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R., (2004). *Hematologia de peixes teleósteos*. 1ªed. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 131p.
- Tenório, R. A., (2003). Aspectos da biologia reprodutiva do niquim *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Actinopterygii, Pimelodidae) e crescimento da progênie em diferentes condições ambientais. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura)—Departamento de Pesca, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

- Tenório, R. A.; Santos, A. J. G.; Lopes, J. P.; de Souza Nogueira, E. M., (2006). Crescimento do niquim (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876), em diferentes condições de luminosidade e tipos de alimento. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 28(4): 305-309.
- Thomé, R. G.; Domingos, F. F. T.; Santos, H. B.; Martinelli, P. M.; Sato, Y.; Rizzo, E.; Bazzoli, N., (2012). Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue and Cell*, 44(1): 54-62.
- Tveiten, H.; Johnsen, H. K., (1999). Temperature experienced during vitellogenesis influences ovarian maturation and the timing of ovulation in common wolffish. *Journal of Fish Biology*, 55(4): 809-819.
- Tyler, C. R.; Sumpter, J. P., (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6(3): 287-318.
- Utoh, T.; Horie, N.; Okamura, A.; Mikawa, N.; Yamada, Y.; Tanaka, S.; Oka, H. P.; Tsukamoto, K., (2013). Water temperature manipulation can induce oocyte maturation and ovulation in the common *Japanese conger*, *Conger myriaster*. *Aquaculture*, 392: 120-127.
- Urbinati, E. C.; Zanuzzo, F. S.; Biller-Takahashi, J. D., (2014). Estresse e sistema imune em peixes. Pp. 87-105. In: *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Edição: Bernardo Baldisserotto, José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati. Jaboticabal: FUNEP, 336p.
- Urbinati, E. C.; Zanuzzo, F. S.; Serra, M.; Wolkers, C. P. B.; Sabioni, R. E., (2015). Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em species nativas. Pp. 381-416. In: Tavares-Dias, M.; Mariano, W.S. (Org.). *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos, Editora Pedro & João, 429p.

- Van Bohemen, C. G.; Lambert, J. G. D.; Goos, H. T.; Van Oordt, P. G. W. J., (1982). Estrone and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *General and Comparative Endocrinology*, 46(1): 81-92.
- Weber, A. A.; Moreira, D. P.; Melo, R. M. C.; Vieira, A. B. C.; Prado, P. S.; da Silva, M. A. N.; Bazzoli, N., Rizzo, E., (2017). Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Science of The Total Environment*, 592: 693-703.
- Winemiller, K. O., (1989). Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia*, 81(2): 225-241.
- Wootton R.J.; Smith C., (2015). *Reproductive Biology of Teleost Fishes*. 4 ed. Oxford: John Wiley & Sons, 368 p.
- Yamada H.; Satoh R.; Ogoh M.; Takaji, K.; Fujimoto, Y.; Hakuba, T.; Chiba, H.; Kambegawa, A.; Iwata, M., (2002). Circadian changes in serum concentrations of steroids in Japanese char *Salvelinus leucomaenis* at the stage of final maturation. *Zoological Science*, 19: 891-898.