

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**ESTERÓIDES SEXUAIS EM PIRACANJUBA (*Brycon
orbignyanus*)**

Daniel Antonio Rotili
Zootecnista/UFSM
Mestre em Zootecnia/UFSM

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de
Doutor em Zootecnia

Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Rotili, Daniel Antonio
ESTERÓIDES SEXUAIS EM PIRACANJUBA (*Brycon
orbignyanus*) / Daniel Antonio Rotili. -- 2018.
110 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Espermatogênese. 2. Gonadotrofinas. 3. GnRH.
4. Oogênese. 5. Reprodução induzida. I. Streit Jr,
Danilo Pedro, orient. II. Título.

Daniel Antonio Rotili
Mestre em Zootecnia

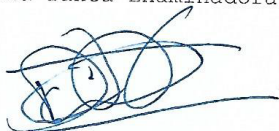
TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM ZOOTECNIA

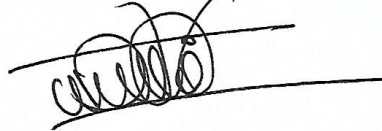
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 23.03.2018
Pela Banca Examinadora



DANILO PEDRO STREIT JR.
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

Homologado em: 02/05/2018
Por



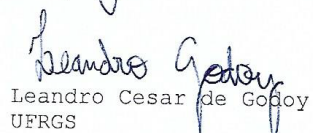
DANILO PEDRO STREIT JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



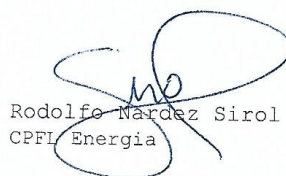
Leonardo José Gil Barcellos
UPF



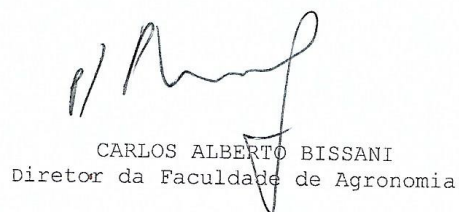
Diógenes Henrique de Siqueira-Silva
UNIFESSPA



Leandro Cesar de Godoy
UFRGS



Rodolfo Nardes Sirol
CPFL Energia



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que de forma incondicional me apoiaram, buscando sempre as melhores maneiras, para que alcançasse meus sonhos e chegar onde estou hoje. Agradeço em especial a minha esposa, Daiane Michele Bonacina, que esteve ao meu lado, incentivando nos momentos de incertezas e dificuldades, e em alguns momentos renunciou seus desejos, em favor das minhas necessidades, contribuindo para que todos os obstáculos fossem superados até a concretização deste momento. Ao meu filho Otávio Bonacina Rotili, que mesmo não compreendendo, colaborou muito nesta caminhada, proporcionando alegria e diversão nos momentos difíceis.

Ao meu orientador e professor Danilo Pedro Streit Jr, pelos ensinamentos, conselhos e experiências compartilhadas, e pela confiança que sempre depositou em mim.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia por possibilitar a realização do curso de Doutorado em Zootecnia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelas bolsas de doutorado, e ao Juan, proprietário da Piscicultura Panama, por abrir as portas, disponibilizando peixes e estrutura para realização dos trabalhos.

Ao Professor Leonardo Barcellos, por abrir as portas de seu laboratório para realização das análises, e disponibilizar a aluna de pós doutorado Gessi Koakoski, que não mediu esforços na realização e discussão das análises.

Aos colegas e amigos do grupo de pesquisa AQUAN, com os quais dividi momentos de alegria e frustrações. Obrigado pela convivência e auxílio nas atividades em geral.

Enfim, agradeço a Deus por colocar pessoas desta grandeza ao meu lado. Sendo assim, finalizo com um Muito Obrigado a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização do Doutorado.

ESTERÓIDES SEXUAIS EM PIRACANJUBA (*Brycon orbignyana*)¹

Autor: Daniel Antonio Rotili

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Resumo: O objetivo, deste estudo foi investigar o comportamento dos hormônios esteróides 17β -Estradiol (E_2), 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP), Testosterona (T) e 11-Ketotestosterona (11-KT), em piracanjuba *Brycon orbignyana* de diferentes sexos e idades, na estação reprodutiva, e nas fêmeas submetidas à reprodução induzida. Os animais utilizados no trabalho, eram criados em piscicultura comercial, mantidos em 3 viveiros, separados por lotes de diferentes idades. A coleta dos animais, consistiu de quatro machos e cinco fêmeas (48 meses), identificados através do dimorfismo sexual da espécie, e as demais idades, (12 e 24 meses), coletaram-se, 20 peixes de cada idade, para identificação do sexo através de histologia. Já o experimento de caracterização dos esteróides sexuais na reprodução induzida, foram coletadas cinco fêmeas, selecionadas através das características com: abdome abaulado, papila urogenital, saliente e avermelhada. Após captura, os peixes foram transportados ao laboratório, onde houve coleta de sangue, para quantificação do perfil plasmático de E_2 , 17α -OHP, T e 11-KT. Posteriormente, os animais foram abatidos e suas gônadas coletadas e fixadas, a fim de que fosse realizada análise histológica para identificação do sexo. Na reprodução induzida, foi coletado sangue em dois momentos: pré-indução (PI) e pós-extrusão (PE). O nível plasmático de E_2 nos machos de 12 meses destaca sua ação no processo de proliferação e renovação das espermatogônia observado em machos imaturos. Nas fêmeas o E_2 apresentou os maiores níveis ($P < 0,05$) nos animais de 48 meses, confirmando assim, sua principal função na estimulação do processo de vitelogênese, e maturação final do oócito. Quanto aos andrógenos T e 11-KT, os maiores níveis ($p < 0,05$) foram observados nos peixes adultos (48 meses), permitindo afirmar que estes atuam como *feedback* negativo, do FSH e *feedback* positivo do LH, fundamental no processo de maturação final e liberação dos gametas, além de regular o comportamento reprodutivo. O resultado da 17α -OHP, sugere que, nas idades estudadas, é indispensável por participar como precursor dos principais esteróides (T, E_2 e 11-KT), além da $17\alpha,20\beta$ dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha,20\beta$ -DHP), essencial no estágio final de maturação, e desova na reprodução induzida.

Palavras-chave: Espermatogênese, gonadotrofinas, GnRH, oogênese, peixes reofílicos

¹Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (167p.) Marco, 2017.

SEX STEROIDS IN PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*)¹

Author: Daniel Antonio Rotili
Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

Abstract: The objective of this study was to investigate the physiological behavior of steroid hormones 17 β -Estradiol (E₂), 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OHP), testosterone (T) and 11-Ketotestosterone (11-KT) in *Brycon orbignyanus* with different sex and ages on the reproductive season and in females submitted to induced reproduction. The animals used in the study were kept in three ponds on a commercial fish farming, separated by lots with different ages. The sampling of animals consisted of the collection of four males and five females (48 months) identified by the sexual dimorphism of the specie. In the other groups (12 and 24 months), 20 fish of each age were collected for identification of sex through histology. In the experiment with characterization of the sexual steroids in the induced reproduction, were collected five females selected through the following characteristics: bulging abdomen and prominent reddish genital papilla. After capture, the fish were transported to the laboratory, where blood was collected for quantification of the plasma profile of E₂, 17 α -OHP, T and 11-KT. Subsequently, the animals were slaughtered and their gonads were collected and fixed for histological analysis. In the induced females, blood was collected at two moments: pre-induction (PI) and post-extrusion (PE). The plasma profile of E₂ is fundamental in immature males, highlighting its action in the process of proliferation and renewal of spermatogonia, observed in males of 12 months. In females E₂ presented the highest levels (P <0.05) in animals at 48 months, thus confirming its main function in the stimulation of the vitellogenesis process and final oocyte maturation. The highest levels (p <0.05) of T and 11-KT androgens were observed in adult fish (48 months), allowing to affirm that they are acting as FSH negative feedback and LH positive feedback, fundamental in the final maturation and release of the gametes, besides regulating the reproductive behavior of the fish. The results of 17 α -OHP suggest this hormon is fundamental in the studied ages because it is a precursor of the main steroids (T, E₂ and 11-KT) and 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α , 20 β -DHP), essential in the final stage of maturation and spawning in induced reproduction.

Key words: spermatogenesis; gonadotropins; GnRH, oogenesis; teleost reofílico

¹Doctoral Thesis in Animal Science – Animal Production, School of Agronomy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (167p.) March, 2017.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. <i>Brycon orbignyanus</i>	14
2.2. Reprodução	16
2.3. Regulação da liberação das gonadotrofinas	17
2.4. Gonadotrofinas (GtHs).....	18
2.5. Esteroides sexuais	20
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	25
3.1. Hipóteses	25
3.2. Objetivo geral.....	25
3.3. Objetivos específico	25
CAPÍTULO II	26
Esteróides sexuais em machos de <i>Brycon orbignyanus</i> em diferentes idades no período reprodutivo	26
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO III.....	45
Esteróides sexuais em fêmeas de <i>Brycon orbignyanus</i> em diferentes idades no período reprodutivo	45
INTRODUÇÃO.....	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
RESULTADOS	52

DISCUSSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
CAPÍTULO IV	64
Esteróides sexuais na indução a reprodução artificial de <i>Brycon orbignyana</i>.....	64
INTRODUÇÃO.....	67
MATERIAL E MÉTODOS	69
RESULTADOS	71
DISCUSSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
CAPÍTULO V	82
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	83
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
6. VITA	96
7. APÊNDICE	97

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO I	12
Figura 1 – Piracanjuba (<i>Brycon orbignyana</i>). Fonte: Acervo pessoal.....	15
Figura 2 – Diagrama esquemático, da fisiologia hormonal, regulação crescimento do oócito A, e regulação da maturação do oócito B (Senthilkumaran <i>et al.</i> , 2004).	19
Figura 3 – Diagrama das principais influencia hormonais sobre a espermatogênese em teleósteos. (Knapp & Carlisle, 2011).	20
Figura 4 – Representação esquemática do Modelo "Two Type Cell". Fonte: Adaptado de Senthilkumaran, <i>et al</i> (2004).	23
CAPÍTULO II	26
Figura 1. Perfil plasmático dos esteróides sexuais em <i>B. orbignyana</i> com diferentes idades 12 (n=8), 24 (n=8) e 48 (n=4) meses no período reprodutivo. Os dados estão apresentados em média ± erro padrão da média. A – Perfil plasmático da 17 α -OHP; B – Perfil plasmático de E ₂ ; C – Perfil plasmático da T; D – Perfil plasmático da 11-KT. Letras diferentes acima dos histogramas indicam diferenças estatisticamente pelo Teste múltiplo de Tukey (P<0,05).	44
CAPÍTULO III	45
Figura 1. Perfil plasmático dos esteróides sexuais em fêmeas de <i>B. orbignyana</i> em diferentes idades 12 (n=10), 24 (n=12) e 48 (n=5) meses, no período reprodutivo da espécie. Resultado expresso em M ± EPM. A – Perfil plasmático da 17 α -OHP; B – Perfil plasmático de E ₂ . C – Perfil plasmático da T; D – Perfil plasmático da 11-KT. Letras diferentes acima dos histogramas indicam diferenças estatisticamente pelo Teste múltiplo de Tukey's (P<0,05). (nd = inferior ao limite de detecção).	63
CAPÍTULO IV	64
Figura 1. Perfil plasmático dos esteróides sexuais em <i>Brycon orbignyana</i> pré indução hormonal (PI) e pós extrusão (PE). A – Perfil plasmático da 17 α -OHP (P<0,05); B – Perfil plasmático de E ₂ (P>0,05). C – Perfil plasmático da T (P<0,05); D – Perfil plasmático da 11-KT (P<0,05). Dados são apresentados em média ± e erro padrão da média.	81

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

E₂ - 17β-Estradiol;

T – Testosterona;

11-KT – 11-Ketotestosterona

FSH – Hormônio Folículo Estimulante;

LH – Hormônio Luteinizante;

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina;

GTHs – Hormônios Gonadotróficos;

HHG – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada;

NPY – Neuropeptídio Y;

GABA – Ácido gama-amino butírico;

GTH I – Gonadotrofina I;

GTH II- Gonadotrofina II;

TSH – Tireotropina;

17α-OHP - 17α-Hidroxiprogesterona;

17α,20β-DHP - 17α,20β-dihidroxy-4-pregnen-3-one;

17α,20β-21-DHP - 17α,20β-21-trihidroxy-4-pregnen-3-one;

20β-HSD - 20β-hidroxisteróide-desidrogenase;

MIS – Esteróide Indutor a Maturação;

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O extrativismo das populações de peixes da forma indiscriminada, é um problema que requer soluções e intervenções, pois cerca de 93 milhões de toneladas de peixes foram retiradas diretamente da natureza, tanto das populações marinhas quanto de água doce em todo o mundo no ano de 2014, enquanto que apenas 73 milhões de toneladas vieram da aquicultura, segundo a FAO (2016).

A pesca, realizada de forma descontrolada com captura de juvenis, ausência de supervisão e medidas protecionistas acarreta diminuição dos estoques naturais. Além da pesca, existem outros fatores, como a fragmentação dos rios pela construção de barragens, que modifica as áreas de desova coletiva e perturba a rota de migração reprodutiva de algumas espécies. A introdução de espécies exóticas, desmatamento ciliar e a poluição dos rios também impactam os estoques naturais de peixes, aumentando o risco de extinção das espécies (Agostinho & Gomes 2005).

Em 2016, havia 3130 espécies de peixes de água doce conhecidas no Brasil (Reis et al., 2016). Destas, 312 encontram-se na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção conforme portaria MMA N° 445/2014, incluindo a “piracanjuba” *Brycon orbignyanus* (Brasil, 2014).

A piracanjuba apresenta excelente aceitação junto ao mercado consumidor, pela ótima qualidade da carne, além de apresentar comportamento agressivo durante a pesca esportiva. Estes fatos explicam o porquê da exploração maciça da espécie, que somado aos fatores supracitados leva a redução drástica das populações nativas remanescentes, acarretando listar no “Livro Vermelho da Fauna Ameaçada” (Oyakawa et al., 2009, Brasil 2014).

Um das estratégias adotadas na conservação e manutenção das espécies ameaçadas de extinção, são os programas de repovoamento (Sirol & Britto 2006). Porém, é necessário um respaldo científico em áreas como a da genética, uma vez que problemas relacionados à perda de variabilidade genética são os mais recorrentes em programas de repovoamento (Lopera-Barrero et al., 2010). Apesar desses estudos prévios, visando programa de repovoamento, é necessário o desenvolvimento de estudos que avaliem outros pontos biológicos e fisiológicos durante o desenvolvimento embrionário, larval, engorda de juvenis, além de contínuo monitoramento das populações quanto a sua presença no ambiente e também a diversidade genética entre as populações (Honji et al., 2017).

Deste modo, a piscicultura de conservação passou a exercer um papel fundamental na preservação das espécies ameaçadas de extinção. Entretanto, quando as espécies reofílicas são mantidas sob condições de cativeiro, ocorre bloqueio no processo reprodutivo, como é o caso da piracanjuba, provavelmente pela ausência de condições ambientais propícias, entre elas temperatura, pluviosidade e fotoperíodo (Mylonas et al., 2010), somado ao estresse provocado pelo confinamento (Milla et al., 2009; Schreck, 2010).

Nesta conjuntura, muitas destas espécies apresentam suas gônadas desenvolvidas até o estágio avançado de maturação, porém as etapas finais do processo reprodutivo, como maturação final dos oócitos e desova natural só são atingidas mediante tratamento hormonal (Batlouni *et al.*, 2006; Mylonas *et al.*, 2010). Desta forma, as espécies reofílicas precisam ser induzidas hormonalmente em cativeiro para desencadear o processo de maturação final e desova nas fêmeas e promover aumento do volume de sêmen nos machos (Mylonas *et al.*, 2010).

A reprodução induzida da piracanjuba ocorre de maneira satisfatória (Lopera-Barrero *et al.*, 2014). Porém, é preciso enfatizar o entendimento da biologia e da dinâmica populacional das espécies para implementar a aplicação de medidas efetivas para preservar os estoques pesqueiros (Ribeiro-Filho *et al.*, 2011).

Portanto, o entendimento da fisiologia envolvida na idade da primeira maturação, dinâmica do desenvolvimento gonadal e os eventos fisiológicos associados ao processo reprodutivo da piracanjuba mantida em cativeiro, são importantes na contribuição do conhecimento da biologia reprodutiva da espécie que apresenta disfunções reprodutivas neste ambiente.

Somado ao fato da piracanjuba, estar na lista de espécies ameaçadas de extinção, torna-se urgente desenvolver ações a fim de conhecer a fisiologia desta espécie, para que não corra o risco de ser extinta sem nem mesmo ter sido estudada. O conhecimento da interação de aspectos biológicos e fisiológicos vem a ser uma ferramenta útil, para o aperfeiçoamento de técnicas já utilizadas ou para a elaboração de outras mais eficientes e econômicas, de forma a contribuir para o manejo adequado dos reprodutores e aperfeiçoar o processo reprodutivo na piscicultura comercial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Brycon orbignyanus*

A ordem Characiformes contém aproximadamente 2000 espécies distribuídas em 23 famílias, sendo 19 exclusivamente neotropicais (Oliveira *et al.*, 2011; Eschmeyer & Fong, 2017). Apesar de sua taxonomia ainda pouco esclarecida, a família Bryconidae, possui 89 espécies disponíveis e 50 espécies válidas, distribuídas em duas subfamílias, Salminae e Bryconinae. O gênero *Brycon* está incluído dentro da subfamília Bryconinae, que é composta por 78 espécies disponíveis e 46 válidas (Eschmeyer & Fong, 2017), sendo considerado um dos gêneros mais numerosos com 42 espécies descritas.

Espécies do gênero *Brycon* se distribuem desde o sul do México até o Panamá, ao longo das bacias hidrográficas da América do Sul trans-Andina, nas principais bacias hidrográficas da América do Sul cis-Andina e na maioria dos sistemas costeiros do Caribe e Atlântico (Lima, 2003; Abe *et al.*, 2014). São espécies consideradas de médio a grande porte, podendo atingir mais de 70 cm e com grande importância na América Central e do Sul principalmente como fonte de alimento (Lima, 2003).

A piracanjuba ou bracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Figura 1) distribui-se ao longo da bacia do rio da Prata, onde estão os rios Paraguai, Paraná e Uruguai (Lima, 2003), que, por muitos anos figurou entre as espécies com maior importância comercial em registros de pesca (Carolsfeld *et al.*, 2003), com exemplares registrados na natureza atingindo tamanho máximo de 79,5 cm e 6,0 Kg (Godoy, 1975). Apresenta o corpo fusiforme e comprimido com a boca ampla e terminal, com três séries de dentes multicuspidados no pré-maxilar e duas no dentário. Possui o corpo prateado, dorso castanho escuro com uma mancha negra na base do pedúnculo caudal estendendo-se até os raios caudais medianos. A nadadeira caudal é avermelhada com uma faixa mediana escura (Britto *et al.*, 2003; Vaz *et al.*, 2000). Assim como a maioria das espécies do gênero, apresenta hábito alimentar onívoro, porém com alterações ao longo do desenvolvimento ontogenético, com preferência por alimentos de origem animal e zooplâncton nas fases larvais e frutas e sementes na fase juvenil e adulta (Cavalcanti, 1998; Meurer, 1999; Vaz *et al.*, 2000; Garcia-Careño *et al.*, 2002; Zaniboni-Filho & Schulz, 2003).

Na natureza, a piracanjuba realiza grandes migrações reprodutivas durante os meses de novembro a fevereiro, período que coincide com os maiores índices pluviométricos, temperaturas elevadas e maior disponibilidade de alimento, o que permite uma maior sobrevivência das proles. Esta estratégia de migração entre os locais de alimentação e reprodução, além de estar relacionada com os processos fisiológicos da maturação final dos gametas, permite maximizar a utilização do ecossistema, pois assim a espécie busca os melhores locais para cada etapa de seu desenvolvimento (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003).

A piracanjuba apresenta desova total e sazonal, primeira maturação tardia, alta fecundidade, ovos pequenos, baixo investimento parental e desenvolvimento oocitário sincrônico por grupos, com desova justamente no período de cheias após a migração (Winemiller, 1989; Vazzoler & Menezes, 1992).



Figura 1 – Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Fonte: Acervo pessoal.

Quando mantidas em cativeiro, a piracanjuba, não atinge a maturação completa e, a desova natural, consequência do ambiente restrito que impossibilita sua migração. Porém, responde bem à técnica de indução à reprodução artificial, utilizada com sucesso para, as espécies reofílicas em cativeiro. Atualmente, existem inúmeras variações de manejo hormonal em peixes. Todavia, o uso de extrato de hipófise de peixes maduros, ainda continua sendo uma das técnicas mais utilizadas, para induzir a maturação final, dos peixes migratórios brasileiros (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004).

Em *B. orbignyanus*, duas aplicações são normalmente requeridas em fêmeas, por necessitar dose mais alta, em comparação aos machos, sendo assim, (10% do hormônio são aplicados em primeiro instante, para estimular a migração da vesícula germinativa, os 90% restante, aplicado em segundo instante, para romper a vesícula germinativa, e liberação dos oócitos). Nos machos, ocorre apenas uma aplicação (100% simultaneamente a segunda aplicação das fêmeas), de forma a obter a sincronização na liberação dos gametas (Lopera-Barreto, 2007).

Apesar do sucesso obtido na reprodução induzida, algumas espécies são geralmente muito sensíveis ao estresse elevado gerado pelo manejo, neste sistema de reprodução artificial, resultando em altas taxas de mortalidade dos reprodutores (Lopera-Barreto, 2009). Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos, de forma a diminuir o estresse, a perda dos reprodutores, durante o processo reprodutivo (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004; Lopera-Barreto, 2009). Portanto, são necessários estudos referentes à fisiologia reprodutiva durante o processo de reprodução artificial, de modo a buscar informações, que possam aperfeiçoar o processo reprodutivo, somado a compreensão do atraso a primeira desova.

2.2. Reprodução

A reprodução tem papel central nos processos produtivos tanto em ambientes naturais como em ambientes de cativeiro, garantindo não apenas a propagação das espécies, mas também garantir a variabilidade genética entre dois indivíduos (Strüssmann & Nakamura, 2002). Os peixes representam o grupo mais numeroso e diverso entre os vertebrados, com uma enorme variedade de estratégias e processos reprodutivos, os quais se refletem em uma grande quantidade de conjuntos anatômicos e funcionais, que ao longo dos processos evolutivos se adaptam às circunstâncias ambientais em que, cada espécie está inserida (Redding & Patiño, 2000).

Entre os modos reprodutivos descritos para vertebrados, os peixes apresentam todos eles, incluindo o gonocorismo, hermafroditismo e unissexualidade (Piferrer, 2009). Sendo assim, o processo reprodutivo dos peixes, pode ser executado dos mais variados modos, desde a liberação de feromônio, construção ou não de ninhos, realização de corte, até, cuidado ou não com a prole. Isso tudo, somado a migração reprodutiva nas formas apresentadas pela piracema em nossos rios, ou naquelas em que grandes alterações osmóticas do meio se fazem necessárias (migração catadrônica/riomar, ou anadrônica/mar-rio), o que demonstra a complexidade etológica que envolve o fenômeno da reprodução nos peixes (Hoar *et al.*, 1983; Borges, 1987).

A partir, da complexidade que envolve o processo reprodutivo, o conhecimento das características fisiológicas envolvidas na reprodução das espécies é de fundamental importância, para o entendimento dos processos de determinação e diferenciação sexual, idade a primeira maturação, além de, servir também como base para o entendimento das demais características reprodutivas.

A idade da primeira maturação sexual dos peixes, é dependente de vários fatores que atuam em conjunto, entre os quais podemos citar as diferenças inter e intra espécie, idade, tamanho, características individuais e fatores ambientais. Um exemplo é a carpa que, em regiões tropicais e subtropicais, se torna madura no seu primeiro ano de vida, enquanto que, na Europa Central, leva três anos e, no norte da Europa, precisa atingir quatro anos para se reproduzir (Woynarovich & Horváth, 1983). Alterações no ambiente também podem influenciar nas estratégias reprodutivas. Barbieri *et al.* (2004) observou que o dourado (*Salminus brasiliensis*) e curimba (*Prochilodus lineatus*), vem reduzindo o tamanho e a idade de primeira maturação como tática reprodutiva dessas espécies em resposta à intensa sobre pesca e das adversidades abióticas a que estão submetidas.

Interações entre fatores endógenos e ambientais são críticas para o desencadeamento da desova e sucesso reprodutivo de peixes neotropicais (Lowe Mc Connell, 1987). Sendo assim, a partir do momento em que a idade e o peso mínimo são atingidos, para o início da reprodução, estímulos ambientais, como precipitação pluviométrica, temperatura e fotoperíodo são captados por neuro-receptores e traduzidos através de sinais neuroendócrinos ao hipotálamo, induzindo a produção de fatores liberadores de gonadotrofinas, estimulando a liberação de hormônios gonodotróficos e a produção de esteróides sexuais, que são responsáveis pela maturação dos gametas (Nagahama, 1994, Nagahama & Yamashita, 2008). As múltiplas e complexas interações hormonais entre os

órgãos sensoriais e os reprodutivos se resumem fundamentalmente na participação do eixo HHG, que sintetiza e libera, GnRH, GtHs, FSH e/ou LH, esteróides gonadais (andrógenos, progestágenos e estrógenos), além de neuromoduladores do processo reprodutivo que podem estimular e/ou inibir este processo (como por exemplo: dopamina, hormônio inibidor de gonadotrofinas, ácido gama-aminobutírico, fator de crescimento semelhante a insulina, neuropeptídeo Y), entre outras substâncias (Blázquez & Somoza, 2010; Bobe & Labbé, 2010; Guiguen *et al.*, 2010; Levavi-Sivan *et al.*, 2010; Luckenbach *et al.*, 2010; Mylonas *et al.*, 2010; Zohar *et al.*, 2010).

De uma forma geral, em condições adequadas para os animais, todo processo supracitado ocorre naturalmente, com o desenvolvimento das gônadas, maturação, liberação e fertilização dos gametas, sendo em geral, nos peixes, a desova e a fertilização ocorrem no ambiente externo (Rocha & Rocha, 2006). Porém, isto se altera de alguma forma, ainda pouco esclarecida, quando espécies reofílicas migradoras são transferidas para o cativeiro, pois neste ambiente confinado, os peixes migradores não conseguem eliminar os seus gametas de forma natural. Nestas condições, as gônadas desenvolvem-se até a maturação avançada, e as etapas finais do processo reprodutivo, tais como maturação final e ovulação só são atingidas mediante tratamentos hormonais. Desta forma, em condições de cativeiro, as espécies reofílicas necessitam ser induzidas hormonalmente, para que se possam atingir os processos de maturação final e desova em fêmeas e propiciar o aumento do volume de sêmen nos machos (Batlouni *et al.*, 2006; Mylonas *et al.*, 2010).

2.3. Regulação da liberação das gonadotrofinas

A reprodução dos peixes é regulada pela interação do sistema nervoso com o sistema endócrino, e esta interação é regulada pelo eixo HHG, que compõem e liberam fatores internos, os hormônios hipotalâmicos, hipofisários e gonadais. Em linhas gerais, o hipotálamo sintetiza e GnRH que, regulado pela Kisspeptina, estimula as células gonadotrópicas da adeno-hipófise a liberar as GtHs, que apresentam papel fundamental, no controle da maturação dos gametas, durante a maturidade sexual, mediado por hormônios esteróides, e a ovulação e a desova podem ser reguladas por fatores não esteroidogênicos (Goswami *et al.*, 1985).

As ações hipofisiotróficas do GnRH são mediadas através da ligação a receptores específicos na membrana das células gonadotróficas na adeno-hipófise (Conn & Crowley, 1994). Estes receptores de GnRH pertencem a uma superfamília de receptores acoplados à proteína G e que possuem uma única cadeia de polipeptídeo com sete domínios transmembranar hidrofóbicos separados por torções extra e intra-celulares hidrofílicas de comprimento variável (Sealfon *et al.*, 1997). Interação do GnRH com o seu receptor desencadeia uma cascata de reações intracelulares que se inicia com a ativação da proteína G eleva à produção de um segundo mensageiro do tipo diacilglicerol ou trifosfato de inositol, que por sua vez estimulam a liberação de seus reservatórios de íons de cálcio intracelular (Klausen *et al.*, 2002). Além disso, se ações do GnRH podem ser mediadas por outras vias de sinalização intracelulares que induzem a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e de ácido araquidônico (Bogerd *et al.*, 2002, Pati & Habibi, 2002).

Os primeiros receptores de GnRH em peixes, foram detectados na hipófise, entretanto já se sabe da expressão destes, em demais tecidos, como no cérebro, gônadas, fígado e rins, reforçando que estes decapeptídeos não só exercem funções reprodutivas a nível de hipófise, mas podem atuar como neurotransmissores e/ou neuromoduladores no cérebro, e como fatores autocrino ou paracrino nas gônadas (Marshall *et al.*, 1976; Habibi & Pati, 1993; Yu *et al.*, 1998). A presença de receptores de GnRH em tecidos somáticos que não estão envolvidos diretamente na reprodução, sugere um papel importante destes receptores na mediação das ações autocrinas/paracrinas do GnRH sobre outros processos fisiológicos que ainda devem ser bem esclarecido.

A hipófise de peixe se encontra unida ao hipotálamo por um tronco fino denominado neurohipófise, que é constituída por axônios das células neurosecretoras, que penetram, desde o cérebro até a hipófise. A atividade da secreção hormonal na hipófise é controlada por múltiplos fatores neuro-hormonais que são sintetizados em populações neuronais específicas no cérebro e liberadas diretamente na hipófise. Esta inervação direta na hipófise de peixes teleósteos, junto com a identificação de um terminal neurosecretor específico no entorno de um tipo celular hipofisário determinado, permitiu caracterizar que fatores cerebrais podem estar implicados no controle da secreção dos hormônios hipofisários. Assim, a presença de terminais secretores de GnRH, dopamina, neuropeptídeo Y (NPY) e ácido gama-amino butírico (GABA) no entorno próximo as células gonadotrópicas, constitui uma evidencia neuroanatomica de grande importância para identificar as ações destes neuro-hormônios sobre a secreção de gonadotrofinas durante o ciclo reprodutivo de peixes (Kah *et al.*, 1987; 1989; 1992).

2.4. Gonadotrofinas (GtHs)

As GtHs, são os principais hormônios que modulam a função reprodutiva, chamados atualmente de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), são hormônios glicoproteicos, cuja molécula consiste de duas subunidades, α e β , sendo a, subunidade α comum para as duas gonadotrofinas, e também para a tireotropina (TSH), e a subunidade β variável, conferindo a atividade biológica e especificidade aos diferentes hormônios (Baldisserotto *et al.*, 2014).

A expressão gênica e os níveis de ambas GtHs na hipófise e no plasma dos teleósteos variam ao longo do ciclo reprodutivo, inclusive entre machos e fêmeas (Swanson *et al.*, 2003; Yaron & Sivan, 2006). Estudos demonstram que o FSH está presente ao longo de todo ciclo, aumentando significativamente durante a oogênese e espermatogênese inicial e durante a pós-ovulação e pós espermatogênese, em fêmeas e machos respectivamente. Por outro lado, os níveis de LH, que no plasma são baixos ou não está presente durante as primeiras fases de desenvolvimento gonadal, porém são maiores níveis durante a fase de maturação final e ovulação nas fêmeas e espermatogênese e espermição nos machos (Prat *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1999; Senthilkumaran *et al.*, 2004).

Estímulos ambientais e endógenos, chegam ao hipotálamo estimulando produção e liberação de GnRH, que impulsiona a hipófise a liberar FSH, via corrente sanguínea até as células da teca nos folículo ovariano, que converte o colesterol em T, transportada a células foliculares e aromatizada a E₂,

através da enzima aromatase, sob influência do FSH. O E₂ atua no fígado, estimulando a síntese da glicolipofosfoproteína (vitelogenina) que, via corrente sanguínea é absorvida pelo oócito por micropinocitose (dependente de FSH), incorporada ao vitelo. Este processo conduz ao aumento nos níveis plasmáticos de E₂ e T que inibe a síntese de FSH (*Feedback negativo*), estimulando juntamente com GnRH a secreção do LH nas fases finais de vitelogênese, este estimula às células da teca do folículo ovariano a produzir 17 α -OHP, que é transportada às células foliculares e convertida a 17 α ,20 β -dihidroxy-4-pregnen-3-one (17 α , 20 β -DHP) ou 17 α , 20 β -21-trihidroxy-4-pregnen-3-one (17 α , 20 β -21-DHP) pela enzima 20 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (20 β -HSD), dependendo da espécie considerada (Nagahama, 1997; Peter & Yu, 1997; Senthilkumaran *et al.*, 2004; Nagahama & Yamashita, 2008; Lubzens *et al.*, 2010). O hormônio 17 α , 20 β -DHP é conhecido como o hormônio indutor da maturação final e da ovulação (do inglês: Maturation-Inducing Steroid, MIS) na maioria dos peixes (Figura -2).

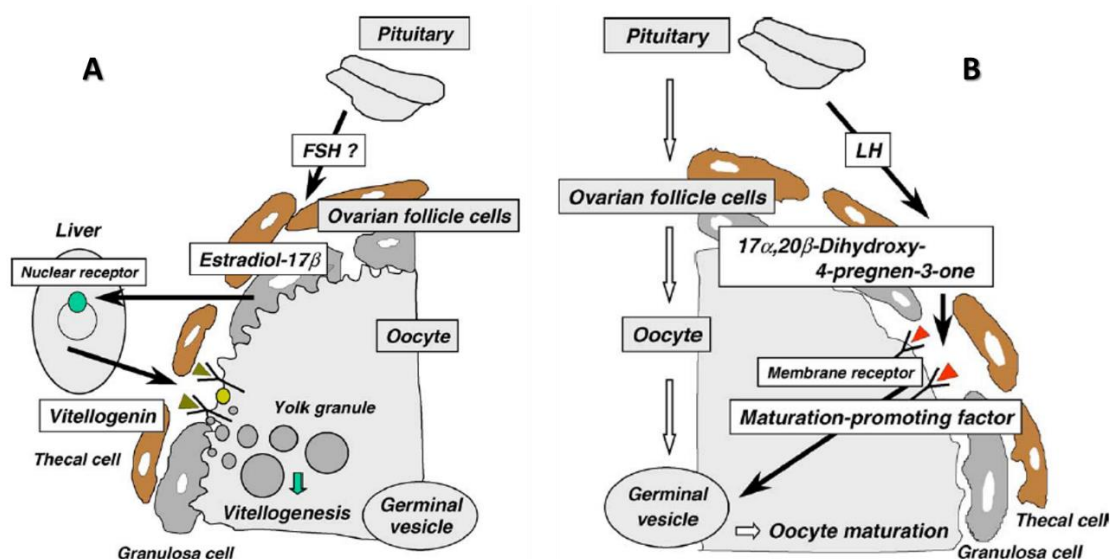


Figura 2 – Diagrama esquemático, da fisiologia hormonal, regulação do crescimento do oócito A, e regulação da maturação do oócito B (Senthilkumaran *et al.*, 2004).

Nos machos de salmonídeos imaturos, o FSH age nos testículos, estimulando o início da espermatogênese. Em outros teleosteos, a 11-KT e a 17 α , 20 β -DHP também são importantes para o início da espermatogênese. A 11-KT estimula as células de Sertoli a produzirem activina, que, em conjunto, estimulam a proliferação das espermatogônias. No início da espermatogênese, o FSH parece estimular a produção de 11-KT nas células de Leydig e a proliferação das células de Sertoli. Já para o final da espermatogênese, o FSH estimula o aumento do número de receptores para LH nas células de Leydig, aumentando a sensibilidade a este hormônio. No final da espermatogênese, há uma diminuição dos níveis de FSH e 11-KT e aumento do LH e 17 α , 20 β -DHP, que é essencial para a maturação do esperma e espermição, pois o 17 α , 20 β -DHP promove o aumento do pH e o volume do esperma, aumentando a motilidade do espermatozoide. No momento da espermição, o LH promove um

aumento dos níveis de 11-KT, a qual estaria envolvida na ruptura dos cistos espermáticos e liberação dos espermatozoides na luz testicular (Figura – 3) (Knapp & Carlisle, 2011; Baldisserotto *et al.*, 2014).

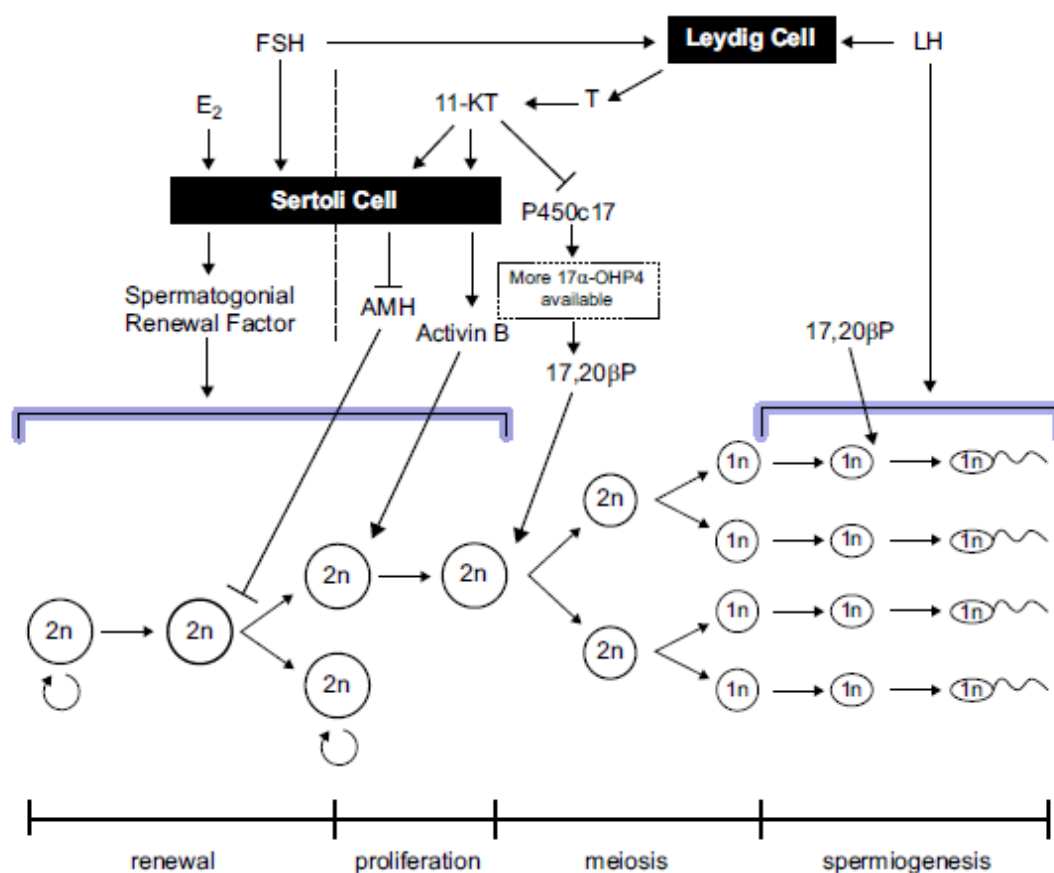


Figura 3 – Diagrama das principais influências hormonais sobre a espermatogênese em teleostes. (Knapp & Carlisle, 2011).

As GtHs exercem suas ações se ligando a receptores de membrana específicos localizados na superfície das células alvos. Foram descritos dois tipos de receptores específicos para as GtHs, sendo que, um se liga o FSH (FSHR) e outro que liga LH (LHR). Estudos com *Oncorhynchus kisutch* demonstraram claramente, que ovários dos peixes teleostes apresentam dois tipos de receptores GtHRs, tipo I e tipo II. Ao mesmo tempo, identificou receptores para LH em ovário de *Salmo trutta trutta* (Quesnel & Breton, 1993). O tipo I (FSHR) interage com ambas GtHs, mas com maior afinidade ao FSH e o tipo II (LHR) se une especificamente ao LH (Yan *et al.*, 1992).

2.5. Esteróides sexuais

Os esteróides sexuais (andrógenos, progestágenos e estrógenos), são responsáveis pela comunicação entre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, indicando o *status* sexual (Zohar *et al.*, 2010). De acordo com Munakata & Kobayashi (2010), estes esteróides sexuais podem atuar em diferentes tecidos (fígado, hipófise, cérebro e na própria gônada). Deste modo, os autores ainda concluem que, alterando a expressão de neuro-hormônios e/ou neurotransmissores e/ou outras substâncias, bem como os seus respectivos

receptores (via feedback), além de serem importantes no comportamento sexual e no momento da desova ou liberação dos espermatozoides pelos peixes teleósteos. Apesar disso, os efeitos precisos deste feedback dos esteróides sexuais no sistema endócrino, principalmente nos neurônios hipotalâmicos (no GnRH e na kisspeptina) e/ou no órgão pineal e/ou nas células da hipófise, estão longe de ser totalmente compreendidos (Zohar *et al.*, 2010).

Hormônios esteróides atuam na diferenciação e manutenção dos tecidos somáticos, gametogênese além de estimular caracteres sexuais secundários e comportamento reprodutivo. Provocam uma variedade de respostas fisiológicas nos tecidos-alvos, tais como divisão celular, diferenciação tecidual, crescimento, síntese de proteínas específicas e contração muscular lisa. Respostas estas, relacionadas com inúmeros processos reprodutivos, desde a diferenciação sexual até comportamento e receptividade sexual. Isto, tudo ocorre através da comunicação permanente entre o complexo HHG, permitindo que, a atividade dos diferentes componentes esteja sincronizada em todas as etapas do ciclo de vida, que é crucial para respostas coordenadas (Lubzen *et al.* 2010).

Os esteróides sexuais, produzidos pelas gônadas, são responsáveis por sinalizar ao hipotálamo e a hipófise, o estado sexual, além de, modular a atividade dos sistemas neuronais que influenciam o eixo reprodutivo. Eles afetam nomeadamente a expressão de neurotransmissores e neuropeptídeos, bem como a dos seus correspondentes receptores no hipotálamo e na hipófise. No entanto, os efeitos precisos de esteróides sexuais sobre os sistemas neuronais acima descritos estão longe de estarem totalmente compreendidos e dados divergentes são relatados em função da espécie, do estado fisiológico, do esteróide gonadal examinado ou dos parâmetros reprodutivos monitorados (Zohar *et al.*, 2010).

Dentre os hormônios esteróides o E₂ é descrito como hormônio “feminino”, porém a sua presença tem sido relatada em inúmeros vertebrados do sexo masculino, assim como em teleósteos (Miura *et al.*, 1999). Estudos demonstraram a presença de três subtipos de receptores estrogênicos (α , β 1 e β 2) em peixes, sendo que, nos machos a maior expressão ocorre nas gônadas, mais especificamente nas células somáticas e células germinativas testiculares (Wu *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2007). Claramente, o E₂ é um “hormônio masculino” indispensável, com papel principal durante a renovação das células primordiais e proliferação das espermatogônias (Miura & Miura, 2003). Além de regular (direta ou indiretamente), a expressão de genes importante na regulação da esteroidogênese (Star, 3 β HSD, aromatese A e B), aumenta a expressão de genes, responsáveis pela codificação das proteínas de ligação ao ácido retinóico I e II, isto, sugere que os hormônios estrógenos controlam a homeostase do ácido retinóico no testículo (Schulz *et al.*, 2010). Da mesma forma estudo em rato, demonstrou que o ácido retinóico é necessário para a proliferação e diferenciação de espermatogônias indiferenciadas (Zhou *et al.*, 2008).

Estudo tendo a *Anguila* como modelo, confirmou através da implantação de E₂, a proliferação por divisão mitótica das células germinativas primordiais e espermatogônias, sendo suprimida após o uso de substância antagonista do estrogênio (Miura *et al.*, 1999). Em Medaka a administração de baixa dose de *ethinyl estradiol*, apresenta efeito similar ao promovido pelo E₂, na

renovação das espermatogônias, porém, elevada dose promove efeito inibitório (Song & Gutzeit, 2003). De acordo com Lahnsteiner *et al.* (2006) a elevação de estrogênio no processo final de amadurecimento, promove redução no volume do líquido seminal, aumentando a densidade espermática, podendo levar à esterilidade. Todos estes resultados reforçam a importância do E₂, durante a renovação das espermatogônias.

Em fêmea, a ação do E₂, está bem esclarecida, principalmente no processo de vitelogênese, sendo sintetizado através da cooperação entre as camadas celulares da teca e granulosa, que circundam os oócitos. Depois de sintetizado é liberado na corrente sanguínea, se ligando aos receptores de estrógenos no fígado, estimulando a síntese da fosfoglicoproteína vitelogenina (Vtg) (Arukwe & Goksoyr, 2003). Depois de sintetizada a Vtg é transportada via sangue até o ovário, onde é absorvida pelo oócito via endocitose, nos receptores de Vtg presentes na superfície da membrana até a completa vitelogênese (Grier *et al.*, 2009). O acúmulo de proteína, vitelo e mRNAs, durante a vitelogênese é necessário para o desenvolvimento embrionário e outras funções, isto tudo ocorre, durante a prófase I do ciclo mitótico, durante o crescimento primário do oócito (Schulz *et al.*, 2010). Miura *et al.* (2007) afirmaram que cerca de 0,4 ng/ml de E₂ foram suficiente para estimular a proliferação mitótica das oogônias em carpa comum (*Cyprinus carpio*), demonstrando que o E₂ estimula a progressão das células germinativas através da oogênese. Já, o progestogênio 17 α -OHP, atua como precursor do hormônio 17 α , 20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-ona (17 α , 20 β -DHP), responsável pela diferenciação e maturação dos espermatozoides, hidratação, mobilidade e capacitação dos espermatozoides no ducto espermático para fertilização (Scott *et al.*, 2010). Nas fêmeas a 17 α , 20 β -DHP é também conhecida como hormônio indutor a maturação (MIS), por atuar, no estágio final de crescimento do oócito, estimulando o reinício e conclusão da primeira divisão meiótica. Assim seguindo para metáfase II, subsequente migração da vesícula germinativa, caracterizando a maturação final, e a capacitação do oócito para ser liberado e fertilizado (Nagahama, 1994; Senthilkumaran *et al.*, 2004; Lubzen *et al.* 2010).

A conversão da 17 α -OHP em 17 α , 20 β -DHP /MIS se inicia na camada de células da teca, que produz 17 α -OHP e libera até a célula da granulosa onde é convertida em 17 α , 20 β -DHP sob ação de GTH, principalmente LH responsável por aumentar a atividade da enzima 20 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (20 β -HSD) principal enzima envolvida na conversão da 17 α -OHP para 17 α , 20 β -DHP (Nagahama, 1987). Estudos realizados, demonstram que a indução de LH/hCG durante a maturação de oócitos, elevam transcritos da enzima 20 β -HSD e sua atividade na camada da granulosa (Kazeto *et al.*, 2001; Senthilkumaran *et al.*, 2004). Enquanto, que nos machos as GTH estimula as células de Leydig a produzir 17 α -OHP, que será convertida pela 17 α , 20 β -DHP nas células de Sertoli pela enzima 20 β -HSD (Schulz *et al.*, 2010).

A falha na maturação final de algumas espécies de teleósteos neotrópicos, quando mantidas em cativeiro, é causada provavelmente devido a uma disfunção nos progestágenos e/ou na enzima 20 β -HSD e/ou na síntese/liberação de LH (Honji *et al.*, 2011). O nível hormonal de 17 α -OHP em *Salminus hilarii* não apresentou variação nas concentrações plasmáticas quando mantidas em cativeiro, sugerindo que ocorre uma falha na enzima 20 β -HSD ou na síntese de LH nos estágios final de maturação oocitária (Amaral *et al.*, 2007).

Além disso, 17α -OHP, também é precursor de outros esteroides sexuais como T, conseqüentemente E_2 (Senthilkumaran *et al.*, 2004; Domingos *et al.*, 2012) (Figura-4).

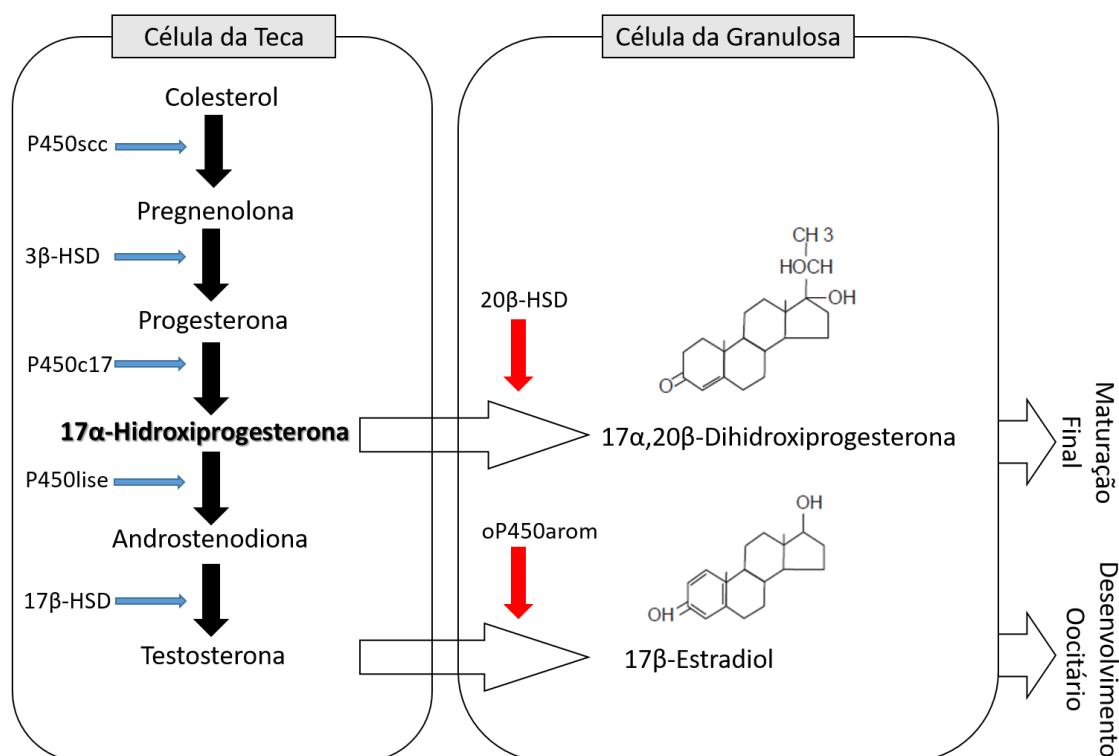


Figura 4 – Representação esquemática do Modelo "Two Type Cell". Fonte: Adaptado de Senthilkumaran, *et al* (2004).

Diferentemente dos mamíferos, nos peixes a T não é o principal andrógeno secretado, uma vez que, o nível mais elevado de 11-KT, demonstra que ele é o andrógeno fisiologicamente funcional nos teleósteos (Schulz *et al.*, 2010; Zohar *et al.*, 2010). Apesar dos andrógenos, serem característicos de machos, também são identificados no plasma de inúmeras fêmeas de teleósteos. Neste caso, o nível plasmático de T em fêmea madura e ovulada, corresponde a capacidade aumentada dos folículos pré-ovulatório para produzir T podendo estar relacionado à diminuição da atividade da aromatase (Kagawa, 2013), além de, desempenhar um papel fundamental no *feedback* do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Lokman *et al.*, 2002; Matsubara *et al.*, 2003). Quanto a 11-KT, sugere-se que na fêmea, desempenha um papel importante na deposição de lipídeo nos oócitos durante crescimento primário (Lokman *et al.*, 2007).

Dois subtipos de receptores de andrógenos (RA) (α e β) foram descritos em peixes e todos são predominantemente expressos nas gônadas (Takeo & Yamashita, 1999; Todo *et al.*, 1999; Ikeuchi *et al.*, 2001). Em machos, os RA, são expressos nas células de sertoli e células intersticiais, mas não em células germinativas (Ikeuchi *et al.*, 2001). Isto sugere que os andrógenos desenvolvem atividades biológicas através das células somáticas no testículo,

porém, influenciam fortemente a expressão do gene testicular. Na truta pré-púbere, a administração dos tratamentos de T e 11-KT produziram efeitos semelhantes em um grupo comum de 155 genes regulados positivamente e 20 regulados negativamente (LeGac *et al.*, 2008).

Alguns desses genes são expressos em células de Sertoli e foram previamente demonstrados para regular a espermatogênese e esteroidogênese. Por exemplo, a expressão do gene de Hormônio-anti-Mulleriano (HAM) que inibe a diferenciação da espermatogonia, é significativamente suprimida pela T e 11-KT (Schulz *et al.*, 2010). Portanto, os andrógenos demonstram serem eficazes na estimulação do processo de espermatogênese, como a multiplicação espermatogônica e na formação de espermatócitos (guppy) ou maturação (killifish) (Remacle, 1976; Billard *et al.*, 1982; Billard, 1986; Nagahama, 1994; Borg, 1994). Também participam do início da puberdade (Miura *et al.*, 1991a, b; Cavaco *et al.*, 1998). Além disso, os andrógenos induzem espermição em algumas espécies, mas foram claramente menos efetivos do que os progestágenos (Ueda *et al.*, 1985).

Mesmo estando entre os principais componentes no controle endócrino da reprodução dos peixes, a ação dos esteróides sexuais no estado fisiológico da gônada, comportamento reprodutivo e na reprodução induzida da piracanjuba mantida em cativeiro, ainda não é compreendido. Portanto, estudos da biologia e fisiologia reprodutiva desta espécie é ainda necessários para o aprimoramento das técnicas de criação, estabelecimento de medidas de conservação da ictiofauna nativa e compreensão do sistema endócrino.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1. Hipóteses

- Os hormônios esteróides – progestágenos, andrógenos e estrógenos, apresentam níveis plasmáticos variados, demonstrando variações dependentes de idade, sexo e estágio de maturação das gônadas.
- A indução a reprodução artificial através do Extrato de Hipófise de Carpa (EHC), produz aumento nos níveis plasmáticos dos hormônios esteróides, promovendo a maturação final e desova nas fêmeas de *B. orbignyanus*.

3.2. Objetivo geral

Investigar o comportamento fisiológico dos hormônios esteroides 17 β -Estradiol (E₂), 17 α -hidroxiprogesteroa (17 α -OHP), Testosterona (T) e 11-Ketotestosterona (11-KT) em animais de diferentes sexos e idades na estação reprodutiva, e dos animais durante a reprodução induzida.

3.3. Objetivos específico

- Caracterizar o nível plasmático dos principais esteroides sexuais (E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT) em fêmeas de *B. orbignyanus* de diferentes idades no período reprodutivo.
- Descrever o nível plasmático dos principais esteroides sexuais (E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT) em machos de *B. orbignyanus* de diferentes idades no período reprodutivo.
- Apresentar o nível plasmático dos principais esteroides sexuais (E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT) durante a reprodução induzida.

CAPÍTULO II

Esteróides sexuais em machos de *Brycon orbignyanus* em diferentes idades no período reprodutivo

Esteróides sexuais em machos de *Brycon orbignyanus* em diferentes idades no período reprodutivo

D. A. ROTILI *[‡], E D. P. STREIT JR*.

* Laboratório de Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil

Fisiologia reprodutiva de *Brycon orbignyanus*

[‡]Autor para quem a correspondência deve ser endereçada: Tel.: +55 55999478503; e-mail: daniel_rotili@hotmail.com

Resumo: O objetivo foi descrever o nível plasmático dos principais esteróides sexuais, 17β -Estradiol (E_2), 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP), Testosterona (T) e 11-Ketotestosterona (11-KT), em machos de diferentes idades no período reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). A coleta dos animais foi realizada em piscicultura comercial, onde lotes de *B. orbignyanus*, eram mantidos em três tanques separados por diferentes idades. No período reprodutivo, da espécie, foram coletados quatro peixes adultos (48 meses), identificados através do dimorfismo sexual da espécie. Para as demais idades, (12 e 24 meses), coletou-se, 20 peixes de cada idade, para determinação do sexo através de histologia. Já no laboratório realizou-se a coleta de sangue, seguido do abate por secção da medula, e coleta das gônadas para posterior análise histológica. O sangue foi centrifugado, e o plasma coletado, para quantificação do perfil plasmático de E_2 , 17α -OHP, T e 11-KT. Foram observadas três fases de desenvolvimento gonadal: imaturo, desenvolvimento (12 e 24) e regressão (48). O nível de E_2 foi maior ($P < 0,05$), nos peixes imaturos ($11,81 \text{ ng ml}^{-1}$), destacando sua ação, no processo de proliferação e renovação das espermatogônias por mitose, observado nos peixes de 12 meses característico do estágio imaturo. A T apresentou, com níveis superiores ($P < 0,05$), nos peixes 24 e 48 ($0,18; 0,21 \text{ ng ml}^{-1}$), o que permite afirmar que está atuando como *feedback* negativo, inibindo a liberação de FSH e *feedback* positivo do LH, importante durante a espermatogênese e espermiogênese. Quanto aos resultados da 11-KT, e a 17α -OHP, sugere que, nas idades estudadas e nos estágios de desenvolvimento apresentados, a espermatogênese e espermiogênese estão ocorrendo, através de renovação por mitose e meiose, visto que, a 11-KT, controla o início da maturação, assim como, a 17α -OHP através da sua importante ação na inicialização da meiose e na espermição, como precursor da *17 α ,20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one* ($17\alpha, 20\beta$ -DHP), que atua durante a espermatogênese, além de, ser essencial para o estágio final de maturação. Portanto, o resultado do E_2 demonstra que este é fundamental para o processo de proliferação e renovação das espermatogônias por mitose. Já T, 11-KT, e 17α -OHP, atua com maior expressão durante a espermatogênese e espermiogênese, caracterizada por divisões meióticas.

Palavras chave: Espermatogênese, gonadotrofinas, GnRH, peixes teleósteos, reprodução

INTRODUÇÃO

Uma das principais características, que diferencia os peixes juvenis dos adultos, é o estado funcional das gônadas. Esta transição para a idade adulta é referida como puberdade, e o sistema endócrino predominantemente responsável por regular os processos reprodutivos é o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) (SCHULZ et al., 1994). Este processo de transição do peixe juvenil até adulto inicia algum tempo após a diferenciação sexual, a partir do surgimento de espermatócitos nos machos e oócitos vitelogênicos nas fêmeas, alcançando à primeira espermição e ovulação, em machos e fêmeas, respectivamente (SCHULZ & MIURA, 2002; PATIÑO & SULLIVAN, 2002).

Geralmente em ambiente natural, machos de *Brycon orbignyanus* atingem a maturidade sexual aos dois anos de idade, já as fêmeas atingem a maturidade com cerca de três anos (ZANIBONI-FILHO & SCHULZ, 2003). Porém, em muitas espécies de teleósteos, tem-se observado maturação sexual prematura nos machos, até um ano antes de alcançar a verdadeira puberdade, esta maturação prematura se caracteriza por uma gametogênese incompleta (BEGTASHI et al., 2004). Este processo de maturação sexual, não é dependente de apenas um fator e sim um conjunto de fatores, desde genéticos, sinais metabólicos e estímulos ambientais (PARENT et al., 2003; OJEDA et al., 2006; NOCILLADO & ELIZUR, 2007).

Dentre os sinais metabólicos, os esteróides sexuais são conhecidos por, iniciar e/ou acelerar a maturação do eixo HHG. Comprovando assim, a participação no desenvolvimento puberal dos peixes. Na truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) imatura, por exemplo, o tratamento com andrógenos aumentou o teor de GnRH no cérebro e a quantidade de gonadotrofinas na hipófise (GIELEN et al., 1982; CRIM & EVANS 1979).

As gonadotrofinas, são responsáveis por, secretar uma série de hormônios que atuam como fatores-chaves para a regulação da reprodução. Entre eles, os hormônios gonadotróficos (GTHs), hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008). Por transporte na corrente sanguínea, FSH e LH alcançam as gônadas, e em ambos os sexos, promovem o desenvolvimento de células germinativas e a produção dos hormônios esteróides sexuais (HAFEZ et al., 2004).

Os esteróides sexuais, progestagênicos, andrógenos e os estrogênios são produzidos principalmente na gônada. Sendo que, os níveis plasmático dos hormônios esteróides mostram variações importantes durante a maturação das gônadas masculinas. Atuando, na diferenciação e manutenção dos tecidos somáticos e gametogênese, além de, regular o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e comportamental reprodutivo, sinalizando ao hipotálamo e a hipófise, seu “status” sexual (ZOHAR *et al.*, 2010).

No entanto, os efeitos precisos dos esteróides sexuais, sobre a fase de desenvolvimento gonadal da piracanjuba, ainda não foram compreendidos, e dados divergentes são relatados, em função da espécie, do estado fisiológico, do esteróide gonadal examinado ou ainda dos parâmetros reprodutivos monitorados. Tendo em vista os pontos abordados, o objetivo deste estudo foi caracterizar os níveis plasmáticos dos principais esteróides sexuais 17β -Estradiol (E_2), 17α -hidroxisprogesterona (17α -OHP), Testosterona (T) e 11-Ketotestosterona (11-KT), em machos de *Brycon orbignyanus* em diferentes idades, no período reprodutivo.

MATERIAL E MÉTODOS

DESENHO EXPERIMENTAL E COLETA DOS ANIMAIS

A coleta dos peixes foi realizada em uma estação de piscicultura comercial, localizada no município de Paulo Lopes (Santa Catarina, Brasil). Foram coletadas piracanjubas (*B. orbignyanus*), de diferentes idades (12, 24 e 48 meses), provenientes do cruzamento de reprodutores coletados na Bacia do Rio Uruguai e mantidos na própria piscicultura. Estes peixes, estavam estocados em 3 viveiros de aproximadamente 200m² cada, densidade aproximada de 0,300 Kg/m², separados por idade.

Durante o período de criação dos peixes, os mesmos eram submetidos ao manejo diário da piscicultura. Recebiam alimentação diariamente “*ad libitum*”, com ração comercial extrusada com teor de 32% de PB, a qualidade de água dos viveiros foi mantida, através da renovação de água, adubação e calagem, conforme as necessidades observadas nas análises realizadas.

No período reprodutivo da espécie, foram selecionados quatro peixes de 48 meses, identificados através do dimorfismo sexual da espécie, cujos machos possuem a nadadeira anal áspera no período reprodutivo. Para as demais idades, (12 e 24 meses), coletou-se, 20 peixes para cada idade por não apresentarem dimorfismo sexual, posteriormente determinou o sexo através de histologia.

Após, a seleção nos tanques os animais foram transferidos ao laboratório, para coleta do material biológico. Previamente ao protocolo da coleta de sangue, os peixes foram anestesiados por imersão em água com benzocaína anestésica (*ethyl-p-aminobenzoate*), solubilizado em etanol, na proporção de 1g/20L de água, e os dados morfométricos foram mensurados. Em seguida, foi coletado sangue por punção da vasculatura caudal, com seringa de cinco ml e agulha descartável previamente heparinizadas. O sangue coletado foi transferido para tubos “falcon 15 ml” heparinizados e centrifugados por 10 min/3000 rpm. O plasma foi separado, acondicionado em

criotubos, congelados e armazenados em Nitrogênio Líquido, até o momento das análises dos hormônios esteróides E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT.

Imediatamente, após a coleta do sangue os animais foram sacrificados por secção da medula, e suas gônadas removidas e imersa em solução fixadora, (formaldeído 4% tamponado), por 12 horas, em seguida foram para álcool 70% (NAKATANI *et al.*, 2001). Os procedimentos de coleta foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), sob protocolo de autorização nº 23841.

DETERMINAÇÃO DOS ESTEROIDES SEXUAIS

O nível plasmático de E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT, foram quantificados por elisaimunoensaio (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA). As análises foram realizadas em duplicada com “kit” comercial de teleósteo para 11-KT (Cayman) e humanos para E₂, 17 α -OHP e T (Interkit). Todos estes ensaios foram realizados de acordo com especificações do fabricante. A leitura das placas foram realizadas em leitora de microplaca (Molecular Devices, SpectraMax 250) com comprimento de onda de 450 nanômetros para E₂, 17 α -OHP e T e 405 nanômetros para 11-KT.

ANÁLISES HISTOLÓGICAS DAS GÔNADAS

Os Fragmentos das gônadas foram desidratadas em séries de álcool (70, 80 e 95%), permanecendo em cada séries durante 24 horas, infiltradas e incluídas em historesina Leica (metacrilato glicol). Secções de 3 μ m foram obtidas em um micrótomo Leica RM2245 com navalhas de vidro e coradas com Azul de Toluidina. As lâminas

foram observadas para definição do sexo dos animais de 12 e 24 meses em microscópio Nikon E200.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises de resultados, os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média ($M \pm EPM$). Valores médios de cada parâmetro foram comparados levando em consideração as três diferentes idades, 12, 24 e 48 meses. As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se teste da ANOVA seguida do teste de comparação de média Tukey para todas as análises. Em todas as análises, diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

DADOS MORFOMÉTRICOS

Os peixes utilizados com as diferentes idades 12, 24 e 48 meses apresentaram peso médio de $145,12 \pm 7,82$, $282,47 \pm 8,66$ e $954,50 \pm 76,90$ g, e comprimento total médio $23,12 \pm 0,37$, $28,03 \pm 0,27$ e $40,52 \pm 0,97$ cm, respectivamente.

ESTEROIDES SEXUAIS

O nível plasmático da 17α -OHP, não diferiu ($P > 0,05$) entre as idades avaliadas (Figura 1 – A). Em relação ao E_2 , o maior nível ($P < 0,05$), foi encontrado nos peixes de 12 meses, em relação aos peixes de 24 e 48 meses, que não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os mesmos (Figura 1 – B).

Quanto aos andrógenos, o nível plasmático da T, foi maior ($P>0,05$) nos peixes de 48 meses em relação aos de 12 meses. Já os peixes, de 24 meses não diferiram ($P>0,05$) dos demais (Figura 1 – C). Os níveis plasmáticos do andrógeno 11-KT apresentaram comportamento semelhante ao da T, com o maior nível ($P>0,05$) nos peixes de 48 meses, em relação, aos níveis dos peixes de idade 12 e 24 meses, que não diferiram ($P>0,05$) entre si (Figura 1 – D).

DISCUSSÃO

O testicular da piracanjuba, *B. orbignyanus*, é classificado como do tipo tubular anastomosado, conforme características descritas por Parenti & Grier, (2004) para teleósteos. Os referidos processos observados em *B. orbignyanus* apresentam diferentes fases de desenvolvimento, desde a fase imatura, subfase desenvolvimento inicial, desenvolvimento, apto a espermição e regressão conforme classificação de Brown-Peterson, et al. (2011).

Os processos de desenvolvimento gonadal, durante o crescimento até o início da puberdade, não são resultado de um único fator, mas, a contribuição de uma série de fatores tais como, idade, genética, sinais metabólicos e estímulos ambientais (PARENT et al., 2003; OJEDA et al., 2006; NOCILLADO & ELIZUR, 2008). Porém, nos teleósteos assim, como em outros vertebrados os processos reprodutivos, incluindo a puberdade, estão, regulados por hormônios liberados ao longo do eixo HHG.

Dentre os hormônios do eixo HHG, os esteróides sexuais, regulam as fases de desenvolvimento gonadal. Entre eles, o E_2 que usualmente é considerado hormônio feminino, no entanto foi observado em nível elevado nos peixes de 12 meses, atuando provavelmente no processo de proliferação, e renovação das espermatogônias por mitose,

característico de animais imaturos. Esta ação do E₂, foi comprovada em estudo realizado por Miura et al, (1999), que após, implantação de E₂ na *Anguilla japonica*, observou proliferação das espermatogônias por mitose, reprimida posteriormente pela utilização de uma substância antagonista ao E₂, comprovando assim, sua ação na regulação da renovação de espermatogônias.

Além da presença de E₂ no plasma dos vertebrados masculinos, estudos observaram a expressão de receptores de estrogênio ao longo do eixo HHG (O'DONNELL et al., 2001; WU et al., 2001; SOCORRO et al., 2000; MIURA et al., 1999). A partir, da inter-relação entre as informações acerca do E₂, encontradas nos juvenis de *B. orbignyanus*, podemos, afirmar que, este desenvolve atividade biológica em machos, estimulando a renovação de células germinativas primordiais e espermatogônias, desempenhando um papel importante no progresso da espermatogênese em peixes imaturos e em desenvolvimento.

Quanto ao andrógeno T, o menor nível foi apresentado, pelos peixes de 12 meses, o que não determina sua menor importância. De acordo com Yaron & Levave-Sivan, (2011), a T é convertida através da aromatização, pela enzima Aromatase (P450) em E₂, que regula as divisões mitóticas da espermatogonia, promovendo à renovação das células germinativas pelas células intersticiais de Leydig sob estimulação gonadotrópica, principalmente FSH.

Assim, os resultados dos níveis de T e E₂ permitem afirmar ainda que, o hormônio gonadotrófico FSH está atuando de forma mais intensa na fase inicial do desenvolvimento gonadal nos peixes de 12 meses. E de fato, está dinâmica hormonal é coerente, visto que, de acordo com Shulz & Miura, (2002), o FSH estimula a proliferação e diferenciação de células de Sertoli, e a síntese de fatores de crescimento, que atuam de forma autocrina e

paracrina, envolvidos na proliferação e diferenciação das células de Sertoli e espermatogônias no desenvolvimento inicial.

Ainda em estudo *in vitro* Kazeto et al, (2008), demonstrou que, entre os hormônios gonadotróficos, o FSH parece ser mais importante na regulação da esteroidogênese, como na espermatogênese em testículos imaturos da *Anguilla japonica*.

Contudo, nos peixes de 48 meses que se apresentavam aptos a liberação de sêmen por pressão no abdômen, o LH está atuando de forma mais intensa, comprovado pelos níveis elevados de T que exerce, efeito de *feedback negativo*, inibindo a liberação de FSH. Isto, foi comprovado por Dickey & Swanson, (1998), que observou a supressão dos níveis de FSH em Salmão após, tratamento com T exógenas. Além disto, o LH, aumenta durante a espermiacção e apresenta picos durante a época de reprodução (MIURA et al 1999; GOMEZ et al., 1999; MATEOS et al., 2003; MIWA et al., 1994; MYLONAS et al., 1997).

Entre os andrógenos, a 11-KT, é considerado o mais importante no desenvolvimento gonadal dos machos (BAROILLER et al 1999). Os resultados permitem, afirmar que a 11-KT, assim como a 17α -OHP estão presentes durante todo desenvolvimento gonadal dos peixes, porém, a 11-KT apresenta o maior nível em animais adultos (48 meses), isto sugere que, mesmo no período reprodutivo, em animais aptos a liberar sêmen a espermatogênese ocorre, em preparação para próxima estação reprodutiva. Uma vez que, níveis baixos de E_2 em conjunto com elevados níveis de 11-KT, estimulam a via de auto renovação espermatogonial (SCHULZ et al, 2010).

A 11-KT assim como, a 17α -OHP estão presentes durante o processo de maturação, evidenciando sua importância na ação de inicialização da meiose e também na espermiacção, como precursor da $17\alpha,20\beta$ dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha, 20\beta$ -DHP), observado nos animais adultos de 48 meses. A conversão de 17α -OHP pela enzima

20 β ,HSD, produz 17 α , 20 β -DHP que atua como hormônio indutor a maturação (MIS) em muitos peixes. (MIURA et al 1992; MIURA et al., 2006; SCHULZ & MIURA, 2002; MIURA et al., 2003; SCHULZ et al, 2010).

Portanto, a partir dos resultados encontrados para 17 α -OHP, pode-se afirmar que desempenha papel importante na espermatogênese, especialmente na mitose e no início da meiose, além do papel bem estabelecido durante o estágio de maturação final, e na expressão das características sexuais secundárias, através da sua conversão em 17 α , 20 β -DHP (AMER et al., 2001). Além disto, a não observação da diferença entre os níveis do hormônio 17 α -OHP, nas diferentes idades, é justificado por sua atuação como precursor de outros esteróides sexuais, como T, conseqüentemente E₂ (SENTHILKUMARAN et al., 2004; DOMINGOS et al., 2012).

Os níveis plasmáticos dos hormônios esteróides, em teleósteos adultos durante a estação reprodutiva, refletem o “status” gonadal, e elevados níveis de 11-KT nos peixes de 48 meses está sendo estimulado principalmente pelo LH, visto que injeção de gonadotropina purificada (contendo principalmente LH), em salmão, estimulou aumento no volume de sêmen e níveis plasmáticos de esteróides sexuais (MIURA et al., 1992).

Além disso, injeções de 11-KT promove o aumento do volume de semen no gold fish (*Carassius auratus*) (YAMAZAKI & DONALDSON 1969). Logo, podemos afirmar através dos resultados, que a produção de 11-KT, é regulada pelos níveis plasmáticos de LH, pois este, estimula a elevação progressiva da 11-KT (SCHULZ & BLUM 1990; SCHULZ, 1984).

Os níveis hormonais, observados nos peixes de 24 meses, estão próximos dos animais adultos, permitindo afirmar que, esta ocorrendo uma falça maturação sexual, caracterizada por uma gametogênese incompleta, muito provavelmente, provocados pelas condições do cultivo em cativeiro, já que geralmente em ambiente natural, os machos de

B. orbignyana atingem a maturidade sexual aos dois anos (ZANIBONI-FILHO & SCHULZ, 2003).

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que os hormônios esteróides estão presentes durante todo desenvolvimento gonadal, em diferentes níveis. Todavia, os níveis dos andrógenos T e 11-KT, demonstram atuar de forma mais intensa nos animais adultos aptos a reprodução, caracterizado por uma espermatogênese final, espermiacão e regressão, sendo a 11-KT necessária para o início da espermatogênese e da produção de esperma, desempenhando papel fundamental na espermiacão.

Já a T, tem como papel fundamental atuar como precursor do E₂ e 11-KT. Portanto, nos peixes de 12 meses, parte da T está sendo aromatizada em E₂ que atua em alguns aspectos na função testicular, especialmente na proliferação por mitose das espermatogônias, sendo indispensável em machos imaturos. Já a 17 α -OHP, é essencial, como precursor da 17 α , 20 β -DHP, T e E₂ desempenhando um papel significativo na mitose e na meiose, além de ser essencial para o estágio final de maturação, provavelmente participando da regulação no comportamento reprodutivo.

Agradecimentos:

Agradecemos à Energética Barra Grande S.A. (BAESA), Campos Novos Energia S.A. (ENERCAN) pelo financiamento da pesquisa através de um projeto P&D – ANEEL 3936-0112/2012 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de doutorado para o primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amer, M. A., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., (2001). Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biology of Reproduction*. **65**, 1057–1066.

Baroiller, J. F., Guiguen, Y., Fostier, A. (1999) Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **55**, 910-931.

Begtashi, I., Rodríguez, L., Molés, G., Zanuy, S., Carrillo, M. (2004). Long-term exposure to continuous Light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aquaculture* **241**, 539-559.

Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., Lowerre-Barbieri, S.K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*. **3**, p.52-70.

Calvo, J. & Dadone, L. A. (1972). Fenómenos reproductivos en el pejerrey (*Basilichthys bonariensis*). 1. Escala y tabla de maduración sexual. *Revista Museo La Plata*. **XI**, 153-163.

Crim, L. W. & Evans, D. M. (1979). Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *General and Comparative Endocrinology*. **37**, 192–196.

Dépêche, J. & Sire, O. (1982). In vitro metabolism of progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone in the testis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich., at different stages of spermatogenesis. *Reproduction Nutrition Développement*. **22**, 427–438.

Dickey, J. T. & Swanson, P. (1998). Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Molecular Endocrinology*. **21**, 291–306.

Domingos, F. F. T., Thomé, R. G., Arantes, F. P., Castro, A. C. S., Sato, Y., Bazzoli, E. R. (2012). Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in an area of influence of a tributary,

downstream from a hydroelectric power dam, Brasil. *Fish Physiology and Biochemistry*. **38**, 1709-1719.

Gielen, J. Th., Goos, H. J. Th., Peute, J., van den Bosch, R. A., van Oordt, P. G. W. J. (1982). The brain–pituitary–gonadal axis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: gonadal hormones and the maturation of gonadotropic cells. *Cell and Tissue Research* **225** 45–56.

Gomez, J. M., Weil, C., Ollitrault, M., LeBail, P. Y., Breton, B., LeGac, F. (1999). Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*. **113**, 413–428.

Hafez, E. S. E., Jainudeen, M. R., Rosnina, E Y. (2004). Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução. In: Hafez, B., Hafez, E.S.E. *Reprodução animal*, 7 ed. Manole.

Kazeto, Y. Kohara, M., Miura, T., Miura, C., Yamaguchi, S., Trant, J. M., Adachi, S., Yamauchi, Y. K. (2008) Japanese eel Follicle Stimulating Hormone (Fsh) and Luteinizing Hormone (Lh): Production of biologically active recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. *Biology of Reproduction*. **79**, 938-946.

Mateos, J., Mañanos, E., Martinez-Rodriguez, G., Carrillo, M., Quérat, B., Zanuy, S. (2003). Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β , and LH β) and their expression during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*. **133**, 216-232.

Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T., Miura, C. (2006). Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **103**, 7333–7338.

Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T., Yamauchi, K. (1999). Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **264**, 230–234.

Miura, T., Ohta, T., Miura, C.I., Yamauchi, K. (2003). Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* **144**, 5504–5510.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y. (1992). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *The Journal of Experimental Zoology*. **261**, 359–363.

Miwa, S., Yan, L., Swanson, P. (1994). Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biology of Reproduction*. **50**, 629-642.

Mylonas, C.C., Scott, A.P., Zohar, Y., (1997). Plasma gonadotropin II, sex steroids, and thyroid hormones in wild striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation and final oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*. **108**, 223–236.

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

Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C., Pavanelli, C. S. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá, PR: Eduem. 378 p.

Nocillado, J. & Elizur, A. (2008). Neuroendocrine regulation of puberty in fish: Insights From the Grey Mullet (*Mugil cephalus*) Model. *Molecular Reproduction and Development*. **75**, 355-361.

O'Donnell, L., Robertson, K. M., Jones, M. E., Simpson, E. R. (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. **22**, 289– 318.

Ojeda, S. R., Lomniczi, A., Mastronardi, C., Heger, S., Roth, C., Parent, A. S., Matagne, V., Mungenast, A. E. (2006). Minireview: The neuroendocrine regulation of puberty: Is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology*. **147**, 1166–1174.

Parent, A. S., Teilmann, G., Juul, A., Skakkebaek, N. E., Toppari, J., Bourguignon, J. P. (2003). The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocrine Reviews*. **24**, 668-693.

Parenti, L. & Grier, H. J. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology*. **44**, 333-348.

Patiño, R. & Sullivan, C. V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleosts fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. **26**, 57-70.

Senthilkumaran, B., Yoshikuni, M., Nagahama, Y. (2004). A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **215**, 11-18.

Schulz, R. & Blüm, V. (1990). Steroid secretion of rainbow trout testis *in vitro*: variation during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*. **80**, 189–198.

Schulz, R. (1984). Serum levels of 11-oxotestosterone in male and 17 β -estradiol in female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*. **56**, 111–120.

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

Schulz, R. W., van der Corput, L., Janssen-Dommerholt, C., Goos, H. J. T. (1994). Sexual steroids during puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*): serum levels and gonadotropin- stimulated testicular secretion in vitro. *Journal of Comparative Physiology [B]*. **164**, 195–205, 1994.

Schulz, R.W., & Miura T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology Biochemistry*. **26**, 43-56.

Socorro, S., Power, D. M., Olsson, P. E., Canario, A. V. M. (2000). Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. *Journal of Endocrinology*. **166**, 293–306.

Wu, C., Patiño, R., Davis, K. B., Chang, X. (2001). Localization of estrogen receptor α and β RNA in germinal and nongerminal epithelia of channel catfish testis. *General and Comparative Endocrinology*. **124**, 12–20.

Yamazaki, F. & Donaldson, E. M. (1969). Involvement of gonadotropin and steroid hormones in the spermiation of the goldfish (*Carassius auratus*). *General and Comparative Endocrinology*. **12**, 491–497.

Yaron, Z., & Levavi-Sivan, B. (2011). Endocrine Regulation of Fish Reproduction. *Encyclopedia of Fish Physiology*. **2**, 1500–1508.

Zaniboni Filho, E., Schulz, U. H. (2003). Migratory Fishes of the Uruguay River. In *Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status*. (Carlsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer, A. eds), pp. 157-194. Victoria, Canada: World Fisheries Trust.

Zohar Y, Muñoz-Cueto, J. A., Elizur, A., Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*. **165**, 438–455.

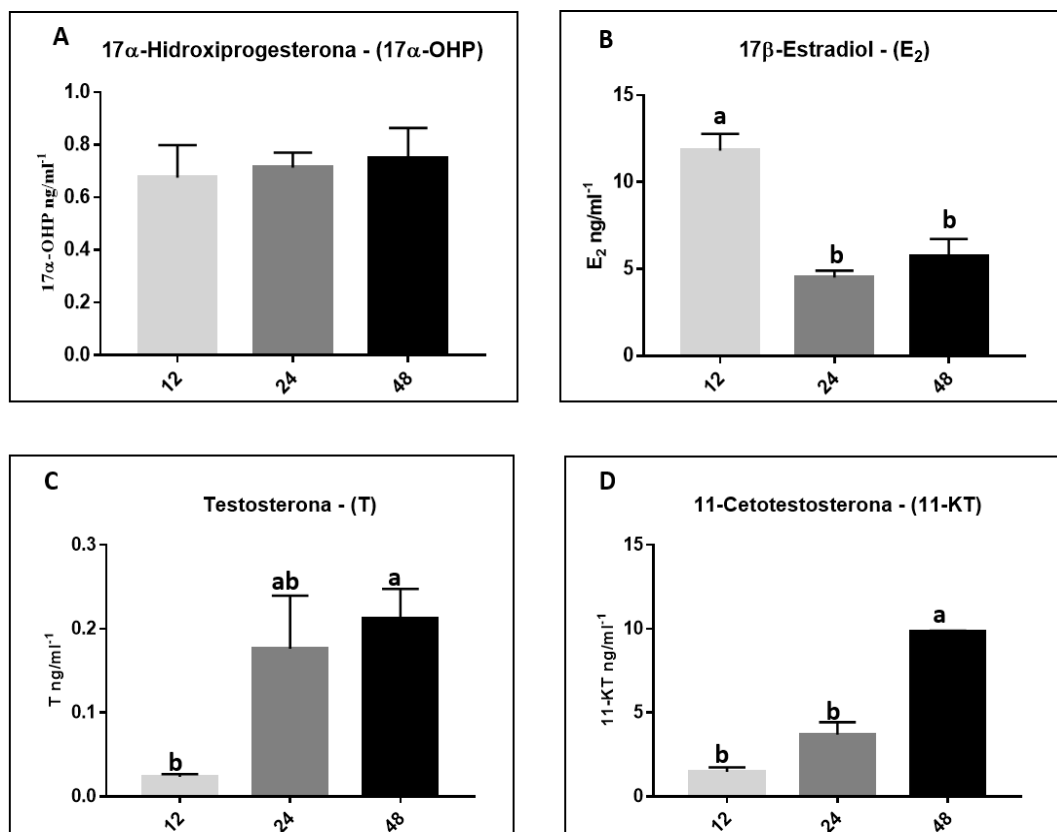


Figura 1. Perfil plasmático dos esteróides sexuais em *B. orbignyana* com diferentes idades 12 (n=8), 24 (n=8) e 48 (n=4) meses no período reprodutivo. Os dados estão apresentados em média \pm erro padrão da média. **A** – Perfil plasmático da 17 α -OHP; **B** – Perfil plasmático de E₂; **C** – Perfil plasmático da T; **D** – Perfil plasmático da 11-KT. Letras diferentes acima dos histogramas indicam diferenças estatisticamente pelo Teste múltiplo de Tukey (P<0,05).

CAPÍTULO III

Esteróides sexuais em fêmeas de *Brycon orbignyanus* em diferentes idades no período reprodutivo

Esteróides sexuais em fêmeas de *Brycon orbignyana* em diferentes idades no período reprodutivo

D. A. ROTILI *^φ E D. P. STREIT JR*.

* Laboratório de Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil

Fisiologia reprodutiva de *Brycon orbignyana*

Resumo: O objetivo foi descrever os níveis plasmáticos dos principais esteróides sexuais, 17β -Estradiol (E_2), 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP), Testosterona (T) e 11-Ketotestosterona (11-KT), em fêmeas de diferentes idades, na estação reprodutiva da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). A coleta dos animais foi realizada em piscicultura comercial, onde lotes de *B. orbignyanus*, eram mantidos em três tanques separados por diferentes idades. No período reprodutivo da espécie, foram coletados cinco peixes adultos (48 meses), identificados através do dimorfismo sexual da espécie. Para as demais idades, (12 e 24 meses), coletou-se, 20 peixes de cada idade, para determinação do sexo através de histologia. Já no laboratório realizou-se a coleta de sangue, seguido do abate por secção da medula, e coleta das gônadas para posterior análise histológica. O sangue, após coleta foi centrifugado, e o plasma coletado, para quantificação do perfil plasmático de E_2 , 17α -OHP, T e 11-KT. O E_2 apresentou maior nível ($P < 0,05$), nos peixes 48 meses ($50,60 \text{ ng ml}^{-1}$), justificando sua importância no processo da vitelogênese e final da maturação. A T não foi observada nos peixes 12 e 24 meses, sugerindo que esteja sendo convertida totalmente em E_2 durante este estágio de desenvolvimento. Já nos peixes de 48 meses, a T está envolvida no mecanismo de manutenção dos oócitos estimulando o processo final de formação e aquisição da competência maturacional, assim como os níveis de 11-KT que sugere estar relacionada com a deposição de lipídeos pelo oócito e o comportamento reprodutivo, dos peixes apto a desova (48 meses). Quanto aos resultados da 17α -OHP, que não apresentou diferença entre as idades, confirma sua importância como precursor da *17 α ,20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one* (17α , 20β -DHP), que atua para induzir a proliferação das oogonias por divisão meiótica no ovário e também estimula o final da maturação, induzindo a desova. Nos peixes mais jovens (12 e 24 meses) os níveis de 17α -OHP, quando relacionado ao estágio de desenvolvimento, permite sugerir, que esteja atuando como precursor dos demais esteróides sexuais, (E_2 e 11-KT), que estão atuando em menores níveis nos peixes de 12 e 24 meses.

Palavras chave: Oogênese, peixes teleósteos, gonadotrofinas, GnRH, reprodução

INTRODUÇÃO

Em seu sentido mais amplo, oogênese é o processo pelo qual as células germinativas primordiais (PGCs), transformam-se em oócitos prontos para serem fertilizados. A oogênese pode ser, descrita em cinco etapas principais: (1) transformação de PGCs em oogonia (diferenciação do sexo), (2) transformação de oogonia em oócitos (início da meiose), (3) crescimento de oócitos sob prisão meiótica, (4) retomada da meiose (maturação) e (5) expulsão do oócito do folículo (ovulação). Podemos ainda, dividir o ciclo reprodutivo em duas fases distintas, sendo que, a primeira fase compreende, as etapas 1 à 3 e a segunda fase 4 e 5. (Yaron & Levavi-Sivan, 2011; Zohar & Mylonas, 2001; Zaniboni Filho & Weingartner, 2007; Mylonas *et al.*, 2010).

Todas as interações durante o crescimento, início da puberdade e reprodução, são decorrente das interações endócrinas, entre o eixo gonadotrópico e o eixo somatotrópico, cujos Hormônios de Crescimento (GH) parecem desempenhar um papel específico na fisiologia da puberdade, gametogênese e fertilidade (LeGac *et al.*, 1993). Somado a isto, os hormônios gonadotróficos (GTHs), Hormônio Foliculo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), ao atuar na gônada, estimulam a síntese dos hormônios esteróides sexuais (andrógenos, estrogênios e progestagenos), considerados os principais efetores do desenvolvimento gonadal (Mylonas *et al.*, 2010).

Entre os hormônios esteróides, o 17β -Estradiol (E_2) é o melhor conhecido, produzido pelas células foliculares, sob estimulação dos GTHs, atua na proliferação das oogônias por mitose, porém. Porém, seu principal papel é induzir a síntese hepática e a secreção da vitelogenina (Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010). Outro esteróide sexual considerado de grande importância no desenvolvimento gonadal e reprodução das fêmeas, é 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP) precursor do hormônio indutor da

maturação final e da ovulação (MIS), e estaria relacionada com o início das divisões meióticas na maioria das espécies (Nagahama 1997; Lubzens *et al.*, 2010). A 17α -OHP é produzida na célula da teca do folículo ovariano, transportada através da membrana basal, na célula da granulosa e convertida a 17α , 20β -dihidroxy-4-pregnen-3-one (17α , 20β -DHP) ou 17α , 20β -21-trihidroxy-4-pregnen-3-one (17α , 20β -21-DHP) pela enzima 20β -hidroxiesteroide-desidrogenase (20β -HSD) (Nagahama, 1997; Nagahama & Yamashita, 2008; Lubzens *et al.*, 2010).

Os andrógenos, testosterona (T) e 11-ketotestosterona (11-KT), são considerados hormônios masculinos, porém, tem sido, observados no plasma de inúmeras fêmeas de teleósteos. No entanto, a verdadeira função neste gênero ainda permanece sendo investigada (Matsubara *et al.*, 2005; Amaral, 2009; Tosaka *et al.*, 2010). Quanto a 11-KT sugere-se que desempenha um papel importante na deposição de lipídeo nos oócitos em crescimento primário (Lokman *et al.*, 2007). Já a T, participa como substrato na síntese de E_2 e de 11-KT (Matsubara *et al.*, 2005; Norris, 2007). Além de, desempenhar um papel muito importante no “*feedback*” do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Lokman *et al.*, 2002; Matsubara *et al.*, 2003).

Contudo, os efeitos precisos dos esteróides sexuais, sobre as fases de desenvolvimento gonadal, estão longe de estarem totalmente compreendidos, e dados divergentes são relatados em função da espécie, estado fisiológico, esteróide gonadal examinado ou os parâmetros reprodutivos monitorados. Tendo em vista os pontos abordados, o objetivo foi caracterizar os níveis plasmáticos dos principais esteróides sexuais (E_2 , 17α -OHP, T e 11-KT), de *B. orbignyana* em fêmeas de diferentes idades, no período reprodutivo.

MATERIAL E MÉTODOS

DESENHO EXPERIMENTAL E COLETA DOS ANIMAIS

A coleta dos peixes foi realizada em uma estação de piscicultura comercial, localizada no município de Paulo Lopes (Santa Catarina, Brasil). Foram coletadas piracanjubas (*Brycon orbignyianus*), de diferentes idades (12, 24 e 48 meses), provenientes da reprodução de matrizes capturadas na Bacia do Rio Uruguai, mantidas na própria piscicultura. Estes peixes, estavam estocados em três viveiros de aproximadamente 200m² cada, densidade aproximada de 0,300 Kg/m², separados por lotes de diferentes idades.

Durante o período de criação dos peixes, os mesmos foram submetidos ao manejo diário da piscicultura. Recebiam alimentação diariamente “*ad libitum*”, com ração comercial extrusada de 32% de PB, a qualidade de água dos viveiros eram mantidas, através da renovação de água, adubação e calagem, conforme as necessidades observadas nas análises realizadas.

No período reprodutivo da espécie, foram selecionadas cinco fêmeas de 48 meses, com características, reprodutivas secundárias: abdome abaulado e papila urogenital saliente e avermelhada. Para as demais idades (12 e 24 meses), coletou-se 20 peixes de cada idade, para determinação do sexo através de histologia.

Posteriormente, a coleta dos peixes nos viveiros foram transferidos para o laboratório. Local onde foram anestesiados por imersão em água com benzocaína anestésica (*ethyl-p-aminobenzoate*), previamente solubilizada em etanol, na proporção de 1g/20L de água, e os dados morfométricos foram mensurados. Na sequência, amostra de sangue, foi coletada por punção da vasculatura caudal, com uso de seringa de cinco ml e agulha descartável previamente heparinizada. O sangue coletado foi transferido para

tubos “falcon 15 ml” previamente heparinizados, centrifugados por 10 min/3000 rpm. O plasma foi separado, acondicionado em criotubos congelados, armazenados em Nitrogênio Líquido, até o momento das análises dos hormônios esteróides E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT.

Imediatamente, após a coleta do sangue os animais foram sacrificados por secção da medula, e suas gônadas rapidamente removidas e imersas em solução fixadora, formaldeído 4% tamponado e após 12 horas, transferidos para álcool 70% para posterior determinação do sexo dos animais de 12 e 24 meses (NAKATANI *et al.*, 2001). Os procedimentos de coleta foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), sob protocolo de autorização nº 23841.

DETERMINAÇÃO DOS ESTEROIDES SEXUAIS

O nível plasmático de E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT, foram quantificados por elisaimunoensaio (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA). As análises foram realizadas em duplicada com “kit” comercial de teleósteo para 11-KT (Cayman) e humanos para E₂, 17 α -OHP e T (Interkit). Todos estes ensaios foram realizados de acordo com especificações do fabricante. A leitura das placas foram realizadas em leitora de microplaca (Molecular Devices, SpectraMax 250) com comprimento de onda de 450 nanômetros para E₂, 17 α -OHP e T e 405 nanômetros para 11-KT.

ANÁLISES HISTOLÓGICAS DAS GÔNADAS

Os Fragmentos das gônadas coletados e fixados foram desidratados em séries alcoólicas (70, 80 e 95% cada uma das séries durante 24 horas), infiltradas e incluídas em historesina Leica (metacrilato glicol). Secções de 3µm foram obtidas em um micrótomo Leica RM2245 com navalhas de vidro e coradas com Azul de Toluidina. As lâminas foram analisadas para determinação do sexo dos animais de 12 e 24 meses em microscópio Nikon E200.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises de resultados, os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média ($M \pm EPM$). Valores médios de cada parâmetro foram comparados levando em consideração as três diferentes idades: 12, 24 e 48 meses. As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se teste de normalidade dos dados da ANOVA seguida do teste de comparação de média Tukey para todas as análises. Em todas as análises, diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

DADOS MORFOMÉTRICOS

Os peixes utilizados com as diferentes idades 12, 24 e 48 meses apresentaram peso médio de $156,58 \pm 26,02$; $246,74 \pm 83,58$ e $1410,80 \pm 197,79$ g, e comprimento total médio $22,94 \pm 1,40$; $26,88 \pm 2,83$ e $50,15 \pm 2,92$ cm, respectivamente.

ESTEROIDES SEXUAIS

Os níveis plasmáticos de 17α -OHP, E_2 , T e 11-KT estão expostos na Figura 1. Todos os dados foram expressos como médias \pm Erro Padrão da Média (EPM). O nível plasmático da 17α -OHP, não apresentou diferença ($P>0,05$) entre as idades 12, 24 e 48 meses das fêmeas de *B. orbignyanus* (Figura 1 – A). Em relação ao E_2 o maior nível ($P<0,05$), foi observado nos peixes de 48 meses, enquanto que os peixes de 12 e 24 meses, não apresentou diferença ($P>0,05$) entre si (Figura 1 – B).

Quanto aos andrógenos, o nível plasmático de T foi observado somente nos peixes com idade de 48 meses (Figura 1 – C). Já o nível plasmático da 11-KT, apresentou comportamento semelhante ao do E_2 , sendo o maior nível ($P<0,05$) nos peixes de 48 meses, em relação, aos níveis dos peixes de idade 12 e 24 meses, que não apresentou diferença ($P>0,05$) entre si (Figura 1 – D).

DISCUSSÃO

Os ovários de *B. orbignyanus* podem ser classificados como do tipo “cistovariano”, com desenvolvimento sincrônico em grupo, apresentando pelo menos dois estágios de desenvolvimento dos oócitos na estação reprodutiva, conforme classificação proposta por Wallace & Seman, (1981).

Durante o processo de desenvolvimento gonadal, o ovário passa por diferentes fases de desenvolvimento, imaturo, desenvolvimento inicial, apto a desova, regressão e regeneração de acordo com proposto por Brown-Peterson *et al.* (2011).

O avanço das fases de desenvolvimento com o decorrer da idade é consequência dos níveis hormonais observados. Os níveis de E_2 , apresentado pelos peixes de 12 e 24 meses, evidenciam sua importância, durante a primeira fase de desenvolvimento, mesmo em níveis menores comparado aos peixes de 48 meses. Baixos níveis de E_2 são suficientes

para estimular a proliferação mitótica das oogônias, que entram em meiose, dando origem a oócito primário, que mesmo preso na prófase da primeira divisão meiótica, começa a crescer durante a puberdade dos peixes (Yaron & Levave-Sivan, 2011; Quaguio-Grassiotto *et al.*, 2013).

A importância das concentrações observadas nos níveis plasmáticos de E₂ durante o crescimento primário, e oócitos pré vitelogênico, oócito vitelogênico e momentos que antecedem a liberação dos oócitos, já foram demonstrados em várias espécies de teleósteos (Patiño & Sullivan, 2002; Estay *et al.*, 2003; Modesto & Canário, 2003; Onuma *et al.*, 2003; Lubzens *et al.*, 2010).

Os resultados dos níveis plasmáticos de E₂ dos peixes de 12 e 24 meses sugere que este esteróide sexual é produzido no ovário desde o estágio inicial da oogênese. Este resultado é coerente, com a observação de Miura *et al.*, (2007), que estudando o papel dos esteroides sexuais *in vitro* no início da oogênese em duas espécie de peixe Japanese huchen (*Hucho perryi*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*), descobriu que 0,1 ng ml⁻¹ de E₂ é suficiente para induzir atividade mitótica nas oogonia de ambas espécies.

Por outro lado, a alta concentração plasmática nos níveis de E₂ nos peixes adultos 48 meses, sugere que esteja relacionado ao crescimento secundário (ou vitelogênico), caracterizado pelo sequestro de precursor do vitelo (vitelogeninas) e proteínas coriônica (coriogeninas), produzidas principalmente pelo fígado, sob estimulação de E₂, comprovado pelo estágio gonadal observado na histologia. O vitelo se acumula no oócito, promovendo o aumento do tamanho, responsável por auxiliar o correto desenvolvimento a partir do reinício da meiose, ou processo de maturação. (Yaron & Levavi-Sivan, 2011; Lubzens *et al.*, 2010).

O nível plasmático de E₂ nos peixes de 48 meses (50,60 ± 4,49 ng ml⁻¹), está acima dos maiores níveis encontrados antes da desova em *Rhandia quelen* (9,01 ± 1,21 ng ml⁻¹)

Barcellos *et al.* (2001) e *Salmo salar* aproximadamente (20 ng ml^{-1}), King & Pankhurst, (2003). Isto sugere, que está ocorrendo uma maior atividade da enzima oP450 α , responsável pela conversão da T em E_2 visto que, os níveis de T observados neste estudo, estão bem abaixo, quando comparado aos resultados apresentados pelos trabalhos supracitados.

Os resultados dos níveis hormonais plasmáticos da 17α -OHP, não diferiram entre as diferentes idades do *B. Orbignyianus* ficando entre, $0,81 \pm 0,14$ e $1,03 \pm 0,11 \text{ ng ml}^{-1}$, estando próximos aos maiores níveis encontrado para o jundiá (*R. quelen*) ($0,94$ e $0,97 \text{ ng ml}^{-1}$), nos meses que antecederam a desova (Barcelos *et al.*, 2001).

O hormônio 17α -OHP é produzido nas células da teca do folículo ovariano, que, estimulada pelos GTHs, é transportada as células da granulosa e convertida a 17α , 20β -dihidroxy-4-pregnen-3-one (17α , 20β -DHP), hormônio conhecido como o hormônio indutor da maturação final e da ovulação (*Maturation-Inducing Steroid*, MIS) na maioria dos peixes (Nagahama, 1997; Nagahama & Yamashita, 2008; Lubzens *et al.*, 2010).

Análise *in vitro* demonstrou que a concentração de 1 ng/ml^{-1} de 17α , 20β -DHP, foi suficiente para promover a síntese de DNA em células germinativas de ovários, resultando no aumento da abundância de complexos sinaptonêmicos e aumento da expressão de Spo11, indicando que 17α , 20β -DHP atua para induzir meiose das oogonias no ovário de peixes teleosteos, estando relacionado no início das divisões meióticas (Miura *et al.*, 2007). Além disto, a 17α -OHP também é precursor de outros esteroides sexuais, como T, conseqüentemente E_2 (Senthilkumaran *et al.*, 2004; Domingos *et al.*, 2012). Justificando assim, a não diferença entre os níveis da 17α -OHP entre as idades.

O nível plasmático da T, não apresentou concentração suficiente para detecção nos peixes de 12 e 24 meses. Isto sugere que, grande parte ou a totalidade da T está sendo convertida em E_2 , pois, os níveis de E_2 , apresentados pelos mesmos peixes, é derivado da

T que a camada de células da teca produz, libera no meio, e é absorvida pelas células da granulosa, e através da enzima oP450arom aromatiza em E₂ (Kagawa *et al.*, 1982; Nagahama 1987; Nagahama *et al.*, 1994; Yaron & Levavi-Sivan, 2011). Todavia, o resultado da T nos peixes de 48 meses, sinaliza que a vitelogênese está completa, uma vez que de acordo com Kime, (1993), a T está envolvida nos mecanismos de manutenção dos oócitos, após, completa vitelogênese.

A T tem importância crucial, no processo final de formação e manutenção dos oócitos, para a aquisição da competência maturacional, isto é, capacidade do oócito pós-vitelogênico em retomar a maturação, quando estimulada pelo MIS, o que, requer a manutenção dos níveis de T acima de um certo limiar (Patiño & Thomas, 1990; Patiño *et al.*, 2001).

Este papel desempenhado pela T no desenvolvimento final, já foi demonstrado em outras espécies. Por exemplo: em *Cyprinus carpio*, a T varia positivamente com a gonadotropina, sugerindo ter uma atuação na maturação final dos oócitos (Aida, 1988). *Perca fluviatilis* tem altas concentrações de T na desova e caem logo após (Noaksson *et al.*, 2005). Em *Seriola lalandi lalandi*, as concentrações de T são maiores durante a vitelogênese e maturação final dos oócitos (Poortenaar, 2001). E em *Morone saxatilis*, o aumento ocorre somente na migração da vesícula germinativa (Mylonas, *et al.*, 1998).

Embora, o 11-KT, seja considerado andrógeno masculino, em *B. Orbignyanus* foi detectado no plasma das fêmeas de todas as idades, assim como em fêmeas de *Oncorhynchus Kisutch* (Fitzpatrick *et al.*, 1986), *O. tshawytscha* (Slater *et al.*, 1994), *Anguilla spp.* (Lokman *et al.*, 1998) e *R. quelen* (Barcellos *et al.*, 2001). Os resultados obtidos nos peixes de 12 e 24 meses, permite sugerir que a 11-KT, possa desempenhar um papel importante, na deposição de lipídeos dos oócitos em crescimento primário, como observado por Lokman *et al.* (2007) em *Anguilla australis*. Além de uma atuação

mais intensa, nos peixes adultos de 48 meses, em estágio final de maturação, embora o nível encontrado ($4,740 \pm 0,759 \text{ ng ml}^{-1}$), esteja bem inferior, aos níveis observados no *R. quelen*, ($91,2 \pm 5,61 \text{ ng ml}^{-1}$), durante o período de reprodução, (Barcellos *et al.*, 2001).

Portanto, no período reprodutivo da espécie *B. orbignyanus*, as fêmeas apresentaram uma relação direta entre os hormônios esteroides, e as fases de desenvolvimento gonadal, onde elevadas concentrações plasmáticas de E₂, T e 11-KT, nos peixes maduros (48 meses), reforçam a necessidade de nível hormonal acima do linear, durante a maturação final, e a proximidade da desova, comparado as menores expressões nos peixes em desenvolvimento (12 e 24 meses). Já a não observação de diferença, nos níveis da 17 α -OHP entre as diferentes idades, reforça sua participação como precursora dos demais esteroides sexuais, além da 17 α , 20 β -DHP.

Agradecimentos:

Agradecemos à Energética Barra Grande S.A. (BAESA), Campos Novos Energia S.A. (ENERCAN) pelo financiamento da pesquisa através de um projeto P&D – ANEEL 3936-0112/2012 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de doutorado para o primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDA, K. (1998). A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. *Aquaculture*. **74**, 11-21.

Amaral, J. S. (2009). Esteróides gonadais e metabolismo lipídico ao longo do ciclo reprodutivo de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) em ambiente natural. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 133p.

Barcellos, L. J. G., Wassermann, G. F., Scott, A. P., Woehl, V. M., Quevedo, R. M., Ittze's, I., Krieger, M. H., Lulhier, F. (2001). Steroid Profiles in Cultured Female

Jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the First Reproductive Cycle. *General and Comparative Endocrinology*. **121**, 325–332.

Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., Lowerre-Barbieri, S.K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*. **3**, p.52-70.

Domingos, F. F. T., Thomé, R. G., Arantes, F. P., Castro, A. C. S., Sato, Y., Bazzoli, E. R. (2012). Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in an area of influence of a tributary, downstream from a hydroelectric power dam, Brasil. *Fish Physiology and Biochemistry*. **38**, 1709-1719.

Estay, F., Díaz, A., Pedrazza, R., Colihueque, N. (2003). Oogenesis and plasma levels of sex steroids in cultured females of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) in Chile. *Journal of Experimental Zoology*. **298**, 60-66.

Fitzpatrick, M. S., Van Der Kraak, G., Schreck, C. B. (1986). Profiles of plasma sex steroid and gonadotropin in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during final maturation. *General and Comparative Endocrinology*. **62**, 437-451.

Grier, H. J., Uribe, M. C., Patiño, R. (2009). The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)* (Jamieson BGM, ed), pp 25-84. New Hampshire: Science Publishers.

Kagawa, H., Young, G., Adachi, S., Nagahama, Y. (1982). Estradiol-17 β production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: Role of the thecal and granulosa cells. *General and Comparative Endocrinology*. **47**, 440–448.

Kime, D.E. (1993). Classical and non-classical reproductive steroids in fish. *Reviews. Fish Biology Fisheries*. **3**, 160-180.

King, H.R. & Pankhurst, N.W. (2003). Ovarian growth and plasma sex steroid and vitellogenin profiles during vitellogenesis in Tasmanian female Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 219, 797-813.

LeGac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P.Y., Loir, M., Mourot, B., Weil, C. (1993). Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*. **11**, 219–232.

Lokman, P. M., Harris, B., Kusakabe, M., Kime, D. E., Schulz, R. W., Adachi, S., Young, G. (2002). 11-oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *General and Comparative Endocrinology*. **129**, 1-12.

Lokman, P. M., Vermeulen, G. J., Lambert, J. G. D., Young, G. (1998). Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachia* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. females. *Fish Physiology and Biochemistry*. **19**, 325-338.

Lokman, P.M., George, K.A., Divers, S.L., Algie, M., Young, Y G. (2007). 11-Ketotestosterone and IGF-1 increase the size of previtellogenic oocytes from shortfinned eel, *Anguilla australis*, *in vitro*. *Reproduction*. **133**, 955-967.

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

Matsubara, H., Lokman, P. M., Kazeto, Y., Adachi, S., Yamaguchi, K. (2005). Serum steroid profiles in artificially maturing female Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*. **243**, 393-402.

Matsubara, M., Lokman, P. M., Senaha, A., Kazeto, Y., Ijiri, S., Kambegawa, A., Hirai, T., Young, G., Todo, T., Adachi, S., Yamaguchi, K. (2003). Synthesis and possible function of 11-ketotestosterone during oogenesis in eel (*Anguilla* spp.). *Fish Physiology and Biochemistry*. **28**, 353-354.

Miura, C., Higashino, T., Miura, T. (2007). A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. *Biology Reproduction*. **77**, 822–828.

Modesto, T. & Canário, A. V. M. (2003). Morphometric changes and sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *General and Comparative Endocrinology*. **131**, 220-231.

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

Mylonas, C.C., Woods Iii, L.C., Thomas, P., Zohar, Y. (1998). Endocrine profiles of females striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during postvitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRH α -delivery systems. *General and Comparative Endocrinology*. **110**, 276-289.

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

Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology*. **38**, 217–229.

Nagahama, Y. (1997). 17 α , 20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids*. **62**, 190–196.

Nagahama, Y. 1987. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological Science*. **4**, 209– 222.

Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C., Pavanelli, C. S. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá, PR: Eduem, 2001. 378 p.

Noaksson, E., Linderoth, M., Gustavsson, B., Zebühr, Y., Balk, L. (2005). Reproductive status in female perch (*Perca fluviatus*) outside a sewage treatment plant processing leachate from a refuse dump. *Science of the Total Environment*. **340**, 97-112.

Norris, D. O. 2007. *Vertebrate endocrinology*. 4Ed. Elsevier. 550p.

Onuma, T., Higashi, Y., Ando, H., Ban, M., Ueda, H., Urano, A. (2003). Year-to-year differences in plasma levels of steroid hormones in pre-spawning chum salmon. *General and Comparative Endocrinology*. **133**, 199-215.

Patiño, R. & C.V. Sullivan N. (2002). Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleosts fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. **26**, 57-70.

Patiño, R. & Thomas, P. (1990). Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the Atlantic croaker: Evidence for two distinct stages of gonadotropic control of final oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. **43**, 818–827.

Patiño, R., Yoshizaki, G., Thomas, P., Kagawa, H., (2001). Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology. PartB* **129**, 427–439.

Poortenaar, C. W., Hooker, S. H., Sharp, N. (2001). Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture*. **201**, 271-286.

Quaguio-Grassiotto, I., Wildner, D. D., Ishiba, R. (2013). Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. **37**, 181–191.

Senthilkumaran, B., Yoshikuni, M., Nagahama, Y. (2004). A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **215**, 11-18.

Slater, C. H., Schreck, C. B., Swanson, P. (1994). Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **109**, 167-175.

Tosaka, R., Todo, T., Kazeto, Y., Lokman, P. M., Ijiri, S., Adachi, S., Yamaguchi, K. (2010). Expression of androgen receptor mRNA in the ovary of Japanese eel, *Anguilla japonica*, during artificially induced ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*. 168: 424-430.

Wallace, R. A. & Selman, K. (1981). Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleost. *American Zoologist*. **21**, 325-343.

Yaron, Z., Levavi-Sivan, B. (2011). Endocrine Regulation of Fish Reproduction. *Encyclopedia of Fish Physiology*. **2**, 1500–1508.

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

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

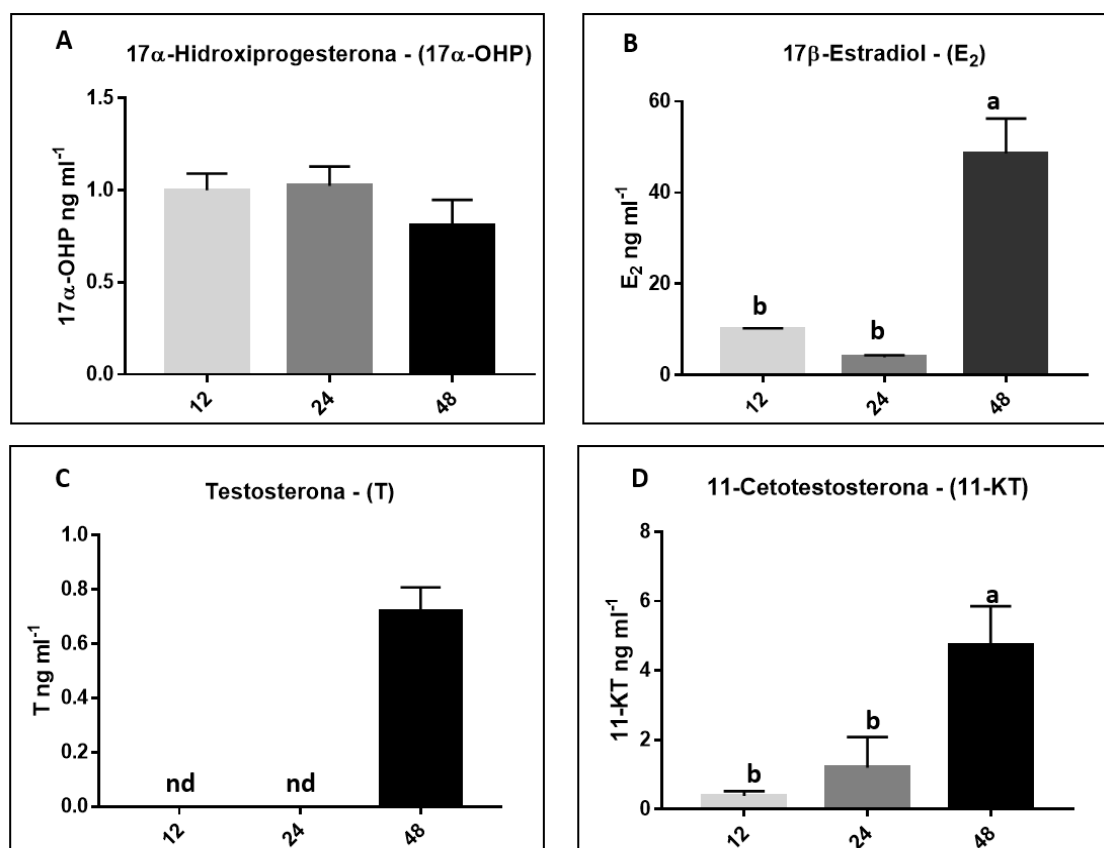


Figura 1. Perfil plasmático dos esteróides sexuais em fêmeas de *B. orbignyana* em diferentes idades 12 (n=10), 24 (n=12) e 48 (n=5) meses, no período reprodutivo da espécie. Resultado expresso em $M \pm EPM$. **A** – Perfil plasmático da 17 α -OHP; **B** – Perfil plasmático de E₂. **C** – Perfil plasmático da T; **D** – Perfil plasmático da 11-KT. Letras diferentes acima dos histogramas indicam diferenças estatisticamente pelo Teste múltiplo de Tukey's ($P < 0,05$). (nd = inferior ao limite de detecção).

CAPÍTULO IV

Esteróides sexuais na indução a reprodução artificial de *Brycon orbignyanus*

Esteróides sexuais na indução a reprodução artificial de *Brycon orbignyanus*

D. A. ROTILI *^φ E D. P. STREIT JR*.

* Laboratório de Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil

Fisiologia reprodutiva de *Brycon orbignyanus*

Resumo: O objetivo foi descrever o nível plasmático dos principais esteróides sexuais, 17β -Estradiol (E_2), 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP), Testosterona (T) e 11-Ketotestosterona (11-KT), em fêmeas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidas à indução a reprodução. A coleta dos animais, foi realizada em piscicultura comercial. Foram selecionadas cinco fêmeas, observando as características sexuais secundárias abdome abaulado e papila urogenital saliente e avermelhada. Os peixes foram transferidos ao laboratório, anestesiados, coletado sangue, momento Pré Indução (PI), seguido da indução a reprodução por EHC, dividido em duas aplicações. Sete horas após a segunda dose, os oócitos foram obtidos por extrusão. Os animais foram anestesiados e coletados sangue, momento pós-extrusão (PE). O sangue após coleta foi centrifugado, e o plasma coletado para quantificação do nível plasmático de E_2 , 17α -OHP, T e 11-KT. A indução a reprodução artificial, através da terapia hormonal, estimulou o aumento da T, 11-KT e 17α -OHP. A T e 11-KT atuam na manutenção e maturação final do oócito, além do comportamento reprodutivo. Já o aumento da 17α -OHP reforça a importância deste como precursor da *17 α ,20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one* (17α , 20β -DHP), responsável por promover a maturação final e desova natural. Isto sugere que a indução hormonal, certamente promove o aumento do LH fundamental para estimular a ação da enzima 20β -HSD, responsável pela conversão da 17α -OHP em 17α , 20β -DHP demonstrando assim, a importância destes hormônios.

key words: Extrato de hipófise de Carpa, oogênese, peixes teleósteos, gonadotrofinas, GnRH, reprodução

INTRODUÇÃO

A Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é nativa das bacias formadas pelos rios Uruguai e Paraná (Zaniboni-Filho *et al.*, 2006). Todavia, consta no Livro Vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais (Machado *et al.*, 1998), além de, ser considerada criticamente ameaçada, pela lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul (Marques *et al.*, 2002).

É uma espécie reofílica, assim como, a maioria das espécies nativas de interesse comercial do Brasil. A migração desencadeia vários processos essenciais para o preparo da reprodução. Entretanto, a privação desse comportamento migratório quando mantidas em cativeiro (viveiros de piscicultura) impede que esses peixes atinjam o preparo fisiológico para a reprodução natural. Estas disfunções reprodutivas que não permitem a reprodução natural são corrigidas através da manipulação ambiental e/ou hormonal, que possibilita a reprodução artificial em sistemas de cultivo comercial (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas *et al.*, 2010).

A fisiologia do ciclo reprodutivo é mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada, onde os estímulos para a reprodução iniciam-se pelo hipotálamo secretando o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Kim *et al.*, 2006), chegando a hipófise estimula a secreção dos hormônios gonadotróficos que atuam como fatores-chaves para a regulação da reprodução (Nagahama & Yamashita, 2008).

Os hormônios gonadotróficos, Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), chegam as gônadas através da corrente sanguínea, e promovem o desenvolvimento de células germinativas e a produção dos hormônios esteróides (Hafez *et al.*, 2004).

Estes apresentam funções fisiológicas fundamentais no desenvolvimento oocitário. Estudos apontam que estas substâncias são responsáveis pela qualidade dos

gametas (Bode & Labbé, 2010). Além de, ser considerados um dos indicadores do bloqueio da reprodução em cativeiro (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas *et al.*, 2010).

Dentre os esteróides sexuais, o mais conhecido é o Estradiol (E₂), descrito como responsável pela indução na síntese e secreção hepática de vitelogenina (Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010). Já o progestágeno, 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP) é o precursor do 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α , 20 β -DHP), considerado como o esteróide responsável pela indução a maturação final e desova de peixes teleósteos (Nagahama, 1997; Amaral *et al.*, 2007).

Em fêmeas a principal função do andrógeno, testosterona (T), é atuar como precursor da biossíntese dos estrógenos, além de substrato para síntese da 11-cetotestosterona (11-KT), considerado o principal andrógeno masculino, mesmo já relatado no plasma de inúmeras fêmeas de teleósteos, onde sua verdadeira função, ainda permanece sendo investigada (Matsubara *et al.*, 2005; Tosaka *et al.*, 2010).

Contudo, para *B. Orbignyanus* informações quanto a fisiologia reprodutiva na indução a reprodução são inexistentes, havendo estudos apenas no âmbito nutricional, criopreservação de semen, morfologia do desenvolvimento ovocitário durante o ciclo reprodutivo. Portanto, a compreensão, da interação dos aspectos relacionados a fisiologia reprodutiva é particularmente necessária para aprimorar o manejo reprodutivo da espécie, de forma a minimizar os efeitos negativos do estresse do cultivo em cativeiro e a reprodução induzida, que leva muitas vezes a perdas de reprodutores e baixa qualidade dos gametas (Ganeco & Nakaghi, 2003).

Sendo assim, o objetivo foi avaliar os níveis plasmáticos dos principais esteróides sexuais (E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT), em fêmeas de *B. orbignyanus* submetidas à indução a reprodução artificial.

MATERIAL E MÉTODOS

DESENHO EXPERIMENTAL E COLETA DOS ANIMAIS

Sessenta piracanjubas, machos e fêmeas com idade de 48 meses, provenientes de parentais selvagens, oriundos do Rio Uruguai, foram selecionados em uma piscicultura comercial. Os animais, foram mantidos em um viveiro de 200m², alimentados diariamente “*ad libitum*”, com ração comercial extrusada com teor de 32% de PB e granulometria de 4-6 mm. Os parâmetros de qualidade da água foram mantidos conforme manejo da piscicultura, através de renovação de água, adubação e calagem.

No período reprodutivo, foram selecionadas cinco fêmeas, identificadas com “tags”, observando-se características sexuais secundárias: abdome abaulado e papila urogenital saliente e avermelhada. Posteriormente, os animais foram transferidos para o laboratório, mantidos em caixas d’água 2000 L, com entrada de água constante, de 7 L/min.

Os peixes foram anestesiados por imersão em água com benzocaína anestésica (*ethyl-p-aminobenzoate*), solubilizado em etanol, na proporção de 1g/20L de água, previamente a indução hormonal e os dados morfométricos foram mensurados. Na sequência, uma amostra de sangue, momento pré-indução (PI), foi coletada por punção da vasculatura caudal, com uso de seringa de 5 ml e agulha descartável previamente heparinizadas. O sangue coletado foi transferido para tubos “falcon 15 ml” heparinizados, centrifugados por 10 min/3000 rpm. Em seguida o plasma foi separado, acondicionado em criotubos, congelados e armazenados em Nitrogênio Líquido, até o momento das análises dos hormônios esteróides E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT.

O extrato de hipófise de carpa (EHC) foi usado para obtenção dos gametas, na posologia de 5,5mg/kg, divididas em duas aplicações com intervalo de 12 horas, 10% inicial e 90% restantes. A água se manteve na temperatura de 24°C, sete horas após a segunda dose, os oócitos foram obtidos por extrusão, e em seguida os animais foram anestesiados novamente, seguindo o mesmo protocolo anteriormente reportado, e coletou-se nova amostra de sangue. O intervalo de coleta entre PI e Pós Extrusão (PE) foi de 19 h e 30min.

DETERMINAÇÃO DOS ESTEROIDES SEXUAIS

O nível plasmático de E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT, foram quantificados por elisaimunoensaio (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA). As análises foram realizadas em duplicada através de “kit” comercial de teleósteo para 11-KT (*Cayman*) e humanos para E₂, 17 α -OHP e T (*Interkit*). Todos estes ensaios, foram realizados de acordo com especificações do fabricante, a leitura das placas foram analisadas em leitora de microplaca (Molecular Devices, SpectraMax 250) com comprimento de onda de 450 nanômetros para E₂, 17 α -OHP e T e 405 nanômetros para 11-KT.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises dos resultados, os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média (M \pm EPM). Valores médios de cada parâmetro foram comparados levando em consideração dois momentos de coleta, Pré-Indução (PI) e Pós-Extrusão (PE). As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se teste T (pareado) para todas

as análises. Em todas as análises, diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Os procedimentos de coleta foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), sob protocolo de autorização nº 23841.

RESULTADOS

O protocolo de indução a reprodução artificial promoveu a desova de quatro das cinco fêmeas, resultando em 80% de sucesso na indução artificial a reprodução, sendo que o peso total da massa oocitária variou entre 163g e 198g (Tabela 1).

ESTEROIDES SEXUAIS

O nível plasmático da 17α -OHP, aumentou ($P < 0,05$) no momento PE em comparação com o instante PI (Figura 1 – A). Em relação ao E_2 , não houve diferença ($P > 0,05$) no momento PI em relação ao instante PE (Figura 1 – B).

Quanto aos andrógenos, tanto o nível plasmático de T quanto da 11-KT das fêmeas de *B. orbignyana*, foram maiores ($P < 0,05$) no momento PE comparado ao instante PI (Figura 1 – C e D).

DISCUSSÃO

A intervenção hormonal com EHC nos *B. orbignyana* foi decisiva para obtenção na taxa de desova de 80%. Este é um panorama recorrente para espécies de teleósteos reofílicos, que em síntese, não ovulam e por consequência não desovam espontaneamente em cativeiro (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas *et al.*, 2010). Porém, a dinâmica dos hormônios esteróides decorrente dos hormônios LH e FSH, presente no EHC, foi decisivo para atingir a maturação final (migração nuclear ou quebra da vesícula germinativa em direção a micrópila) que ocorre após o estágio de oócito vitelogênicos dos *B. orbignyana*, foi mais bem compreendida neste estudo.

A não liberação espontânea dos oócitos pelo *B. orbignyana* em cativeiro era esperado, por ser espécie reofílica. De acordo, com Patiño *et al.* (2001) a aquisição da capacidade de atingir a maturação final dos oócitos e desova requer concentrações hormonais acima dos padrões basais. Conforme Honji *et al.* (2009), esta disfunção está relacionada a alterações na liberação dos progestágenos e/ou na enzima 20 β -HSD e/ou na síntese/liberação de LH quando mantidas em cativeiro.

Neste estudo, o LH presente no EHC, indiretamente foi identificado pelo aumento do nível hormonal da 17 α -OHP em 3,7 vezes PE, comparado com o nível no plasma em *B. orbignyana* PI. Este fato foi decisivo para a maturação final e consequente desovas dos *B. orbignyana*, já que de acordo com Urbatzka *et al.* (2011), o LH desencadeia a síntese dos hormônios 17 α -OHP e 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (Hormônio indutor de maturação-MIH). Cabe ressaltar que o MIH, tem como precursor o 17 α -OHP, através da conversão realizada pela enzima 20 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (20 β -HSD), modulada pela ação do LH (Nagahama & Yamashita, 2008; Lubzens *et al.*, 2010).

A confirmação de que os oócitos de *B. orbignyana* haviam passado pelo processo de vitelogenese, e que a mesma estava completa, ocorreu a partir do baixo nível de E₂ observado em PE e não alteração significativa nos níveis plasmáticos. Sabe-se que a

vitelogenese está completa, e os oócitos prontos para maturação final, quando, ocorre à diminuição do nível de E_2 que é essencial para a retomada da meiose durante a maturação final dos oócitos (Yaron & Levavei-Sivan, 2011). O nível baixo de E_2 no momento PI observado em *B. orbignyana*, é antagônico ao jundiá (*Rhamdia quelen*), que apresentou seus maiores níveis no mês que antecedeu e logo após, a primeira desova, e o menor nível nos meses de inverno, julho e agosto (Barcelos *et al.*, 2001), por exemplo.

O nível da T apresentou aumento significativo nos momento PI e PE, durante a indução a reprodução artificial do *B. orbignyana*, ou seja, levou a aquisição da competência maturacional do oócito. Neste caso, a capacidade do oócito pós-vitelogênico em retomar a maturação, quando estimulada pelo MIS, requer a manutenção dos níveis de T acima de um certo limiar (Patiño & Thomas, 1990; Patiño *et al.*, 2001).

A T está possivelmente envolvida nos mecanismos de manutenção dos oócitos uma vez que a vitelogenese seja completada (Kime, 1993), ou aumento da sensibilidade ao GnRH pela hipófise (Trudeau *et al.*, 1993), em preparação para o aumento pré-ovulatório do LH plasmático. Portanto, se os níveis de T forem inferiores ao ótimo, a ação desse hormônio não pode ser produzida adequadamente (García-López *et al.*, 2006).

Embora, o 11-KT, seja considerado andrógeno masculino nos teleósteos, foi detectado no plasma das fêmeas, assim como, encontrado em fêmeas de *Oncorhynchus kisutch* (Fitzpatrick *et al.*, 1986), *O. tshawytscha* (Slater *et al.*, 1994), *Anguilla spp.* (Lokman *et al.*, 1998) e *R. quelen* (Barcellos *et al.*, 2001). Ainda que, não se tem um conhecimento preciso da função da 11-KT, na fisiologia reprodutiva de fêmeas, o aumento promovido pela indução hormonal, seja necessário para estimular o rompimento dos folículos e liberações dos oócitos, além da alteração no comportamento no momento da desova (Yaron & Levavei-Sivan, 2011).

Portanto, os resultados permitem concluir que a indução a reprodução artificial de *B. orbignyianus*, através do uso de extrato de hipófise de carpa, promoveu aumento na concentração dos hormônios esteroides, 17 α -OHP, T e 11-KT nas fêmeas. Este aumento nos hormônios esteroides, demonstra sua importância na maturação final e desova da espécie em questão, além de, reforçar o sucesso na utilização do EHC, na indução a reprodução de espécies reofílicas.

Agradecimentos:

Agradecemos à Energética Barra Grande S.A. (BAESA), Campos Novos Energia S.A. (ENERCAN) pelo financiamento da pesquisa através de um projeto P&D – ANEEL 3936-0112/2012 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de doutorado para o primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, J. S., Mello, R. G., Honji, R. M., Moreira, R. G. (2007). Effects of migration impediment of *Salminus hilarii* (Teleost: Characidae) on the pituitary-gonad axis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* **148**, S40 - S44.

Barcellos, L. J. G., Wassermann, G. F., Scott, A. P., Woehl, V. M., Quevedo, R. M., Ittze's, I., Krieger, M. H., Lulhier, F. (2001). Steroid Profiles in Cultured Female Jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the First Reproductive Cycle. *General and Comparative Endocrinology*. **121**, 325–332.

Blazer, V. S. (2002). Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*. **26**, 85-101.

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

Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., Lowerre-Barbieri, S.K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*. **3**, p.52-70.

Fitzpatrick, M. S., Van Der Kraak, G., Schreck, C. B. (1986). Profiles of plasma sex steroid and gonadotropin in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during final maturation. *General and Comparative Endocrinology*. **62**, 437-451.

Ganeco, L. N. & Nakaghi, L. S. O. (2003). Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*. **25**, 227-231.

García-López, A., Pascual, E., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G. (2006) Disruption of gonadal maturation in cultured Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup by continuous light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture*. **261**, 789-798.

Grier, H. J., Uribe, M. C., Patiño, R. (2009). The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)* (Jamieson BGM, ed), pp 25-84. New Hampshire: Science Publishers.

Hafez, E. S. E., Jainudeen, M. R., Rosnina, E Y. (2004). Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução. In *Reprodução animal* (Hafez,B., Hafez, E.S.E. eds) 7 ed. Manole.

Honji, R. M., Narcizo, A. M., Borella, M. I., Romagosa, E., Moreira, R.G. (2009). Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiology Biochemistry*. **35**, 109-123.

Kim, J., Hayton, W.L. & Schultz, I.R. (2006). Modeling the brain–pituitary–gonad axis in salmon. *Marine Environmental Research*. **62**, 426–432.

Kime, D.E. (1993). Classical and non-classical reproductive steroids in fish. *Reviews. Fish Biology Fisheries*. **3**, 160-180.

Koya, Y., Mori, H., Nakagawa, M. (2004). Serum 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels in pregnant and non-pregnant female rockfish, *Sebastes schlegeli*, viviparous teleost and its production by post-ovulatory follicles. *Zoological Science of Japan*. **21**, 565-573.

Lokman, P. M., Vermeulen, G. J., Lambert, J. G. D., Young, G. (1998). Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachia* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. females. *Fish Physiology and Biochemistry*. **19**, 325-338.

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

Machado, A. B. M., Fonseca, G. A. B. Da, Machado, R. B., Aguiar, L. M. De S., Lins, L. V. (1998). *Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais* (Ed.). Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 608 p.

Marques, A. A. B., Fontana, C. S., Vélez, E., Bencke, G. A., Schneider, M., Reis, R. E. dos (Org.). (2002). *Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul*. Decreto no 41. 672, de 10 junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA, 52 p.

Matsubara, H., Lokman, P. M., Kazeto, Y., Adachi, S., Yamaguchi, K. (2005). Serum steroid profiles in artificially maturing female Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*. **243**, 393-402.

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

Nagahama, Y. & Kagawa, H. (1982). In vitro steroid production in the postovulatory follicles of the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, in response to salmon gonadotropin. *Journal of Experimental Zoology*. **219**, 105-109.

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

Nagahama, Y. (1997). 17α , 20β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids*. **62**, 190–196.

Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C., Pavanelli, C. S. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá, PR: Eduem, 2001. 378 p.

Patiño, R. & Thomas, P. (1990). Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the Atlantic croaker: Evidence for two distinct stages of gonadotropic control of final oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. **43**, 818–827.

Patiño, R., Yoshizaki, G., Thomas, P., Kagawa, H., (2001). Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology. PartB* **129**, 427–439.

Rocha, M. J. & Rocha, E. (2006). Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes – An overview. In *Fish Endocrinology*. (Reinecke, M., Zaccone, G., Kappor, B.G. eds). pp 570-624. Science Publishers.

Romagosa, E., Batlouni, S. R., Borella, M. I., Leonardo, A. F. G. (2005). Involução dos folículos pós-ovulatórios em *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pisces, Teleostei). *Boletim Instituto de Pesca*. **31**, 129-135.

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 Fish Biology*. **67**, 1446-1459.

Selman, K. & Wallace, R. A. (1989). Review cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoologia Science*. **6**, 211-231.

Slater, C. H., Schreck, C. B., Swanson, P. (1994). Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **109**, 167-175.

Tosaka, R., Todo, T., Kazeto, Y., Lokman, P. M., Ijiri, S., Adachi, S., Yamaguchi, K. (2010). Expression of androgen receptor mRNA in the ovary of Japanese eel, *Anguilla japonica*, during artificially induced ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*. **168**: 424-430.

Trudeau, V.L., Murthy, C.K., Habibi, H.R., Sloley, B.D., Peter, R.E. (1993) Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. *Biology of Reproduction*. **48**, 300-307.

Urbatzka, R., Rocha, M. J., Rocha, E. (2011). Regulation of ovarian development and function in teleosts. In *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, (Norris, D. O. & Lopez, K. H. eds), pp 65–82. London: Academic Press

Yaron, Z., Levavi-Sivan, B. (2011). Endocrine Regulation of Fish Reproduction. *Encyclopedia of Fish Physiology*. **2**, 1500–1508.

Zaniboni-Filho, E., Reynalte-Tataje, D., Weingartner, M. (2006). Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **19**, 233-240.

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

Tabela 1 – Distribuição morfométrica, ponderal e peso da massa oocitaria de *B. orbignyana* após indução hormonal reprodutiva com extrato de hipófise de carpa.

ID	CT (cm)	PESO (kg)	DOSE TOTAL DE EHC (mg)	PO (g)
F-4629	47,90	1,500	8,25	0,168
F-3035	54,01	1,900	10,45	0,159
F-4081	48,10	1,517	8,34	0,163
F-2513	48,15	1,530	8,42	0,198
F-2732*	48,25	1,545	8,50	0

ID: Identificação de cada animal; CT: Comprimento Total; PO: Peso da Massa de Oócitos; EHC: Extrato de Hipófise de Carpa.

* Não desovou.

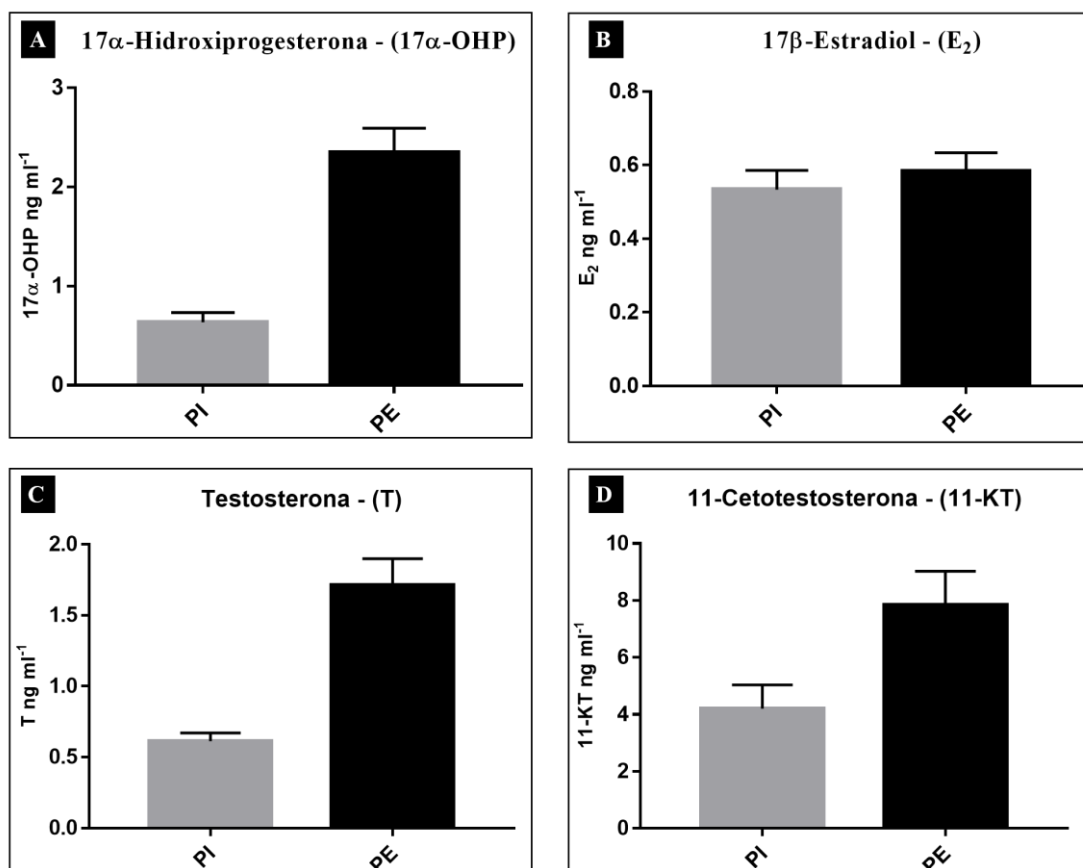


Figura 1. Perfil plasmático dos esteróides sexuais em *Brycon orbignyanus* pré indução hormonal (PI) e pós extrusão PE). **A** – Perfil plasmático da 17 α -OHP (P<0,05); **B** – Perfil plasmático de E₂ (P>0,05). **C** – Perfil plasmático da T (P<0,05); **D** – Perfil plasmático da 11-KT (P<0,05). Dados são apresentados em média \pm e erro padrão da média.

CAPÍTULO V

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos nestes estudos, podemos concluir, que os hormônios esteroides estão presentes nas diferentes idades e sexos, em todas as fases do desenvolvimento gonadal, com diferentes concentrações. Todavia, os níveis dos andrógenos T e 11-KT, nos machos de *B. orbignyanus*, reforçam a atuação diretamente durante a espermatogênese final, espermiacão e regressão, sendo a 11-KT necessária para o início da espermatogênese e da produção de esperma, desempenhando papel fundamental na espermiacão. Mesmo que os animais de 24 meses apresentem, todas as características de peixes aptos a liberar esperma não realizam liberação caracterizando uma falça puberdade, comprovando assim, a importância da 11-KT durante a espermiacão, logo, foi o único hormônio, que apresentou níveis inferiores em relação aos peixes de 48 meses. A T tem como papel fundamental atuar como precursor do E₂ e 11-KT, o que é comprovado através dos elevados níveis de E₂ nos peixes de 12 meses, isto demonstra a importância deste hormônio nos machos, sendo indispensável em alguns aspectos da função testicular, especialmente na proliferação das espermatogônias por mitose. Já a 17 α -OHP, é essencial, como precursor da 17 α , 20 β -DHP, T e E₂ desempenhando um papel significativo na mitose e na meiose, além de ser essencial para o estágio final de maturação, provavelmente participando da regulação no comportamento reprodutivo.

As fêmeas de *B. orbignyanus* na estação reprodutiva, apresentaram uma relação direta entre os hormônios esteróides, e a fase de desenvolvimento gonadal, onde elevadas concentrações plasmáticas de E₂, T e 11-KT, nos peixes maduros (48 meses), reforçam a necessidade de nível hormonal acima do linear, durante a maturação final, e a proximidade da desova, comparado as menores expressões nos peixes em desenvolvimento (12 e 24 meses). Já a não observação de diferença, nos níveis da 17 α -OHP entre as diferentes idades, reforça sua participação como precursora dos demais esteroides sexuais, além da 17 α , 20 β -DHP.

A pesar dos níveis hormonais apresentarem níveis superiores, nos peixes de 48 meses, não é o suficiente para promover à desova espontânea, de forma natural necessitando assim, a indução a reprodução artificial. Os resultados nos níveis hormonais durante a indução a reprodução artificial em *B. orbignyanus*, através do uso de extrato de hipófise de carpa, promoveu aumento na concentração dos hormônios esteróides, 17 α -

OHP, T e 11-KT nas fêmeas. O aumento da 17α -OHP promovido pela indução hormonal, reforça a importância deste como precursor da $17\alpha, 20\beta$ -DHP, responsável por promover a maturação final e desova espontânea. Isto sugere que a restrição a migração em cativeiro dos peixes, gera bloqueio na atividade da enzima 20β -hidroxiesteróide-desidrogenase (20β -HSD), corrigido pela indução hormonal, que promove aumento do LH fundamental para estimular a ação da enzima 20β -HSD, responsável pela conversão da 17α -OHP em $17\alpha, 20\beta$ -DHP demonstrando assim, a importância destes hormônios, além de, reforçar o sucesso na utilização do ECH, na indução a reprodução de espécies reofílicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K. T. et al. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 152, p. 1-15, 2014.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ; S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology**, Washington, v. 19, n. 3, p. 646-652, 2005.
- AMARAL, J. S. et al. Effects of migration impediment of *Salminus hilarii* (Teleost: Characidae) on the pituitary-gonad axis. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, New York, n. 148, p. S40-S44, 2007.
- ARUKWE, A.; GOKSOYR, A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. **Comparative Hepatology**, London, v. 2, n. 1, p. 4, 2003.
- BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 2004. 336 p.
- BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal, SP: Ed. FUNEP, 2014. 336 p.
- BARBIERI, G. et al. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2004.
- BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive cycle of male catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 116-132, 2006.
- BILLARD, R. et al. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 39, n. 1, p. 65-79, 1982.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Developpment**, Jouy-en-Josas, v. 26, n. 4, p. 877-920, 1986.

- BLÁZQUEZ, M.; SOMOZA, G. M. Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 166, n. 3, p. 470-477, 2010.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010.
- BOGERD, J. et al. Two gonadotropin-releasing hormone receptors in the African catfish: no differences in ligand selectivity, but differences in tissue distribution. **Endocrinology**, New York, v. 143, n. 12, p. 4673-4682, 2002.
- BORG, B. Androgens in teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 109, n. 3, p. 219–245, 1994.
- BORGES, O. F. **Caracterização dos estádios de maturação e correlação com avaliações histoquímico-enzimáticas e ultra-estruturais das células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo do *Prochilodus scrofa* - Steindachner**. 1987. 234p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.
- BRITTO, S. G. C. et al. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, 2006. 112 p.
- BROWN-PETERSON, N. J. et al. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries**, v. 3, n. 1, p. 52-70, 2011.
- BROWN-PETERSON, N. F.; GRIER, H.; OVERSTREET, R. M. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n. 1, p. 178–202, 2002.
- CAROLSFELD, J. et al. **Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status**. Ottawa: World Fisheries Trust, 2003. 373 p.
- CAVACO, J. E. B. et al. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish, *Clarias gariepinus*. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 275, n. 6, p. 793–802, 1998.
- CAVALCANTI, C. A. **Proteases digestivas em juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Pisces: Characidae) e a aplicação técnica de digestibilidade *in vitro***. 1998. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.
- CONN, P. M.; CROWLEY JR., W. F. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 45, p. 391-405, 1994.

DOMINGOS, F. F. T. et al. Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in an area of influence of a tributary, downstream from a hydroelectric power dam, Brasil. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 38, n. 6, p. 1709-1719, 2012.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Species by family/subfamily in the catalog of fishes**. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. Rome: FAO, 2016. 200 p.

GARCIA-CARREÑO, F. L. et al. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus*: characteristics and effects of protein quality. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 132, n. 2, p. 343-352, 2002.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil. Subordem Characoidei. Bacia do rio Mogi Guassu**. Piracicaba: Editora Franciscana, 1975.

GOMEZ, J. M. et al. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 113, n. 3, p. 413–428, 1999.

GOSWAMI, S. V.; LAMBA, V. I.; SUNDARARAJ, B. I. Gonadotropin induced oocyte maturation in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) requires steroidogenesis in both interrenal and ovarian. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 57, n. 1, p. 53-63, 1985.

GRIER, H. J.; URIBE, M. C.; PATIÑO, R. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)**. New Hampshire: Science Publishers, 2009. p. 25-84

GUIGUEN, Y. et al. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 352-366, 2010.

HABIBI, H. R.; PATI, D. Extrapituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites in gold fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 11, n. 1-6, p. 43-49, 1993.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, E. Y. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução**. 7.ed. [S.I.]: Manole, 2004.

HOAR, W. S.; RANDAL, D. J.; DONALDSON, E. M. Reproduction. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D. J. **Fish physiology**. London: Academic Press, 1983. v. 9.

HONJI, R. M. **Controle do eixo hipotálamo hipófise gônadas do surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae)**. 2011. 300 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

HONJI, R. M. et al. Biodiversidade e conservação da ictiofauna ameaçada de extinção da bacia do rio Paraíba do Sul. **Revista da Biologia**, v. 17, n. 2, p. 18-30, 2017.

IKEUCHI, T. et al. Two subtypes of androgen and progestogen receptors in fish testes. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, Oxford, v. 129, n. 2-3, p. 449–455, 2001.

ITO, K.; MOCHIDA, K.; FUJII, K. Molecular cloning of two estrogen receptors expressed in the testis of Japanese common goby, *Acanthogobius flavimanus*. **Zoological Science**, Tokyo, v. 24, n. 10, p. 986–996, 2007.

KAGAWA, H. Oogenesis in Teleost Fish. **Aqua-BioScience Monographs**, v. 6, n. 4, p. 99-127, 2013.

KAH, O. et al. Characterization, cerebral distribution and gonadotropin-release activity of neuropeptide Y (NPY) in the gold fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 7, n. 1-6, p. 69-76, 1989.

KAH, O. et al. Involvement of GABA in the neuroendocrine regulation of gonadotrophin release in the goldfish. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 55, p. 396-404, 1992.

KAH, O. et al. Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotropin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 45, n. 6, p. 451-458, 1987.

KAZETO, Y. et al. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 288, n. 3, p. 503-508, 2001.

KIM, J.; HAYTON, W. L.; SCHULTZ, I. R. Modeling the brain–pituitary–gonad axis in salmon. **Marine Environmental Research**, Kidlington, v. 62, p. 426–432, 2006.

KLAUSEN, C.; CHANG, J. P.; HABIBI, H. R. Multiplicity of gonadotropin-releasing hormone signaling: a comparative perspective. **Progress in Brain Research**, Amsterdam, v. 141, p. 111-128, 2002.

- KNAPP, R.; CARLISLE, S. L. Testicular Function and Homonal Regulation in Fish. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates: Fishes**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 43-64.
- LAHNSTEINER, F. et al. Effect of 17 β -estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 79, n. 2, p. 124–131, 2006.
- LeGaC, F. et al. Transcriptional analysis of spermatogenesis regulation by sex steroids in trout. **Cybium**, Paris, v. 32, n. 2, p. 119–121, 2008.
- LEVAVI-SIVAN, B. et al. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 412-437, 2010.
- LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (Ed.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 330-350.
- LOKMAN, P. M. et al. 11-oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 129, n. 1, p. 1-12, 2002.
- LOKMAN, P. M. et al. 11-Ketotestosterone and IGF-1 increase the size of previtellogenic oocytes from short finned eel, *Anguilla australis*, *in vitro*. **Reproduction**, Bristol, v. 133, n. 5, p. 955-967, 2007.
- LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciencia e Investigación Agrária**, Santiago, v. 36, n. 2, p. 191-208, 2009.
- LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Diversidade genética e paternidade de progênies de *Brycon orbignyanus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 541-554, 2014.
- LOPERA-BARRERO, N. M. 2007. **Diversidade Genética e Manejo Reprodutivo da Piracanjuba, *Brycon orbignyanus***. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil, 2007.
- LOWE-MCCONNELL, R. **Ecological studies in tropical fish communities**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 382 p.
- LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 367–389, 2010.

LUCKENBACH, J. A. et al. Regulation of pituitary GnRH receptor and gonadotropin subunits by IGF-1 and GnRH in prepubertal male coho salmon. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 167, n. 3, p. 387-396, 2010.

MACHADO, A. B. M. et al. In: LINS, L. V. (Ed.). **Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. 608 p.

MARSHALL, J. C.; SHAKESPEAR, R. A.; ODELL, W. D. LHRH-pituitary plasma membrane binding: the presence of specific binding sites in other tissues. **Clinical Endocrinology**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 671-677, 1976.

MATSUBARA, M. et al. Synthesis and possible function of 11-ketotestosterone during oogenesis in eel (*Anguilla* spp.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 1-4, p. 353-354, 2003.

MENUET, A. et al. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. **Biology of Reproduction**, New York, v. 66, n. 6, p. 1881-1892, 2002.

MEURER, S. **Digestibilidade aparente da matéria seca, proteína e energia brutas de alguns ingredientes para juvenis de piracanjuba, *Brycon orbignyianus***. 1999. 91 p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

MILLA, S. et al. Corticosteroids: friends or foes of teleost fish reproduction? **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 153, n. 3, p. 242-251, 2009.

MIURA, C.; HIGASHINO, T.; MIURA, T. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. **Biology of Reproduction**, New York, v. 77, n. 5, p. 822–828, 2007.

MIURA, T. et al. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 264, n. 1, p. 230–234, 1999.

MIURA, T. et al. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 13, p. 5774–5778, 1991a.

MIURA, T. et al. Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male eel (*Anguilla japonica*). **Biomedical Research**, Tokyo, v. 12, n. 4, p. 241–248, 1991b.

- MIURA, T.; MIURA, C. I. Molecular control of fish spermatogenesis. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 181- 86, 2003.
- MUNAKATA, A.; KOBAYASHI, M. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 465-468, 2010.
- MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 516–534, 2010.
- NAGAHAMA, Y. 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. **Steroids**, New York, v. 62, n. 1, p. 190-196, 1997.
- NAGAHAMA, Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 38, n. 2, p. 217–229, 1994.
- NAGAHAMA, Y. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. **Zoological Science**, v. 4, p. 209– 222, 1987.
- NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, Growth & Differentiation**, Tokyo, v. 50, suppl. 1, p. S195– S219, 2008.
- NOCILLADO, J.; ELIZUR, A. Neuroendocrine regulation of puberty in fish: Insights From the Grey Mullet (*Mugil cephalus*) Model. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 75, n. 2, p. 355-361, 2008.
- OJEDA, S. R. et al. The neuroendocrine regulation of puberty: Is the time ripe for a systems biology approach. **Endocrinology**, New York, v. 147, n. 3, p. 1166–1174, 2006.
- OYAKAWA, T. O. et al. Peixes de água doce. In: BRESSAN, P. M.; KIERULFF, M. C. M.; SUGIEDA, A. M. (Ed.). **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. [São Paulo]: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 2009. p. 350-424.
- OLIVEIRA, C. et al. Phylogenetic relationships within the species of Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 11, n. 275, 2011.
- PARENT, A. S. et al. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. **Endocrine Reviews**, New York, v. 24, n. 5, p. 668-693, 2003.

PATI, D.; HABIBI, H. R. Involvement of protein kinase C and arachidonic acid pathways in the gonadotropin-releasing hormone regulation of oocyte meiosis and follicular steroidogenesis in the gold fish ovary. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 813-822, 2002.

PATIÑO, R.; SULLIVAN, C. V. Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleosts fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 57-70, 2002.

PETER, R. E.; YU, K. L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 7, n. 2, p. 173-197, 1997.

PIFERRER, F. Determinación y diferenciación sexual en los peces. In: ESTÉVEZ, M. A. C (Ed.). **La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madrid: Publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación observatorio Español de Acuicultura, 2009. p. 247-336.

PRAT, F.; SUMPTER, J. R.; TYLER, C. R. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biology of Reproduction**, New York, v. 54, n. 6, p. 1375-1382, 1996.

QUESNEL, H.; BRETON, Y. B. Solubilization and purification of the gonadotropin (GTH II) receptor from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovaries. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 91, n. 3, p. 272-280, 1993.

REDDING, J. M.; PATIÑO, R. Reproductive Systems. In: OSTRANDER, G. K. (Ed.). **The Laboratory Fish**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 261-270.

REIS, R. E. et al. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

REMACLE, C. Actions hormonales sur les cellules germinales males de *Carassius auratus* L. en culture organotypique. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 29, n. 4 p. 480–491, 1976.

RIBEIRO-FILHO, R. A. et al. Itaipu Reservoir limnology: eutrophication degree and the horizontal distribution of its limnological variables. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 4, p. 889-902, 2011.

ROCHA, M. J.; ROCHA, E. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes – An overview. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPPOR, B. G. (Ed.). **Fish Endocrinology**. [S.l.]: Science Publishers, 2006. p. 570-624.

- SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 549-556, 2010.
- SCHULZ, R. W. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 390–411, 2010.
- SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 43-56, 2002.
- SCOTT, A. P.; SUMPTER, J. P.; STACEY, N. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 183-224, 2010.
- SEALFON, S. C.; WEINSTEIN, H.; MILLAR, R. P. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. **Endocrine Reviews**, New York, v. 18, n. 2, p. 180-205, 1997.
- SENTHILKUMARAN, B.; YOSHIKUNI, M.; NAGAHAMA, Y. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 215, n. 1-2, p. 11-18, 2004.
- SIROL R. N.; BRITTO S. G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA M. G.; HENRY R.; JORCIN, A. **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. [S.l.]: Editora Rima, 2006. p. 275-284.
- SONG, M.; GUTZEIT, H. O. Effect of 17 α -ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis. **Development, growth & differentiation**, v. 45, n. 4, p. 327–337, 2003.
- STRÜSSMANN, C. A.; NAKAMURA, M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, Namur, v. 26, n. 1, p. 13-29, 2002.
- SWANSON, P.; DICKEY, J. T.; CAMPBELL, B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 53–59, 2003.
- TAKEO, J.; YAMASHITA, S. Two distinct isoforms of cDNA encoding rainbow trout androgen receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 9, p. 5674-5680, 1999.
- TODO, T. et al. Fish androgen receptor: cDNA cloning, steroid activation of transcription in transfected mammalian cells, and tissue mRNA levels. **Biochemical Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 254, n. 2, p. 378–383, 1999.

- UEDA, H. et al. Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 59, n. 1, p. 24–30, 1985.
- VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia Ilustrado de Peixes da Bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.
- VAZZOLER, A. E. A. DE M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysii). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 52, n. 4, p. 627-640.
- WINEMILLER, K. O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**, Berlin, v. 81, n. 2, p. 225-241, 1989.
- WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília: FAO, 1983. (Documento Técnico, 201).
- WU, C. et al. Localization of estrogen receptor α and β RNA in germinal and nongerminal epithelia of channel catfish testis. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 124, n. 1, p. 12–20, 2001.
- YAN, L.; SWANSON, P.; DICKHOFF, W. W. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). **Biology of Reproduction**, New York, v. 47, n. 3, p. 418-427, 1992.
- YARON, Z.; SIVAN, B. Reproduction. In: EVANS, D. H.; CLAIBOURNE, J. B. **Physiology of Fishes**. New York: CRC Press., 2006. p. 345–388.
- YU, K. L. et al. mRNA expression of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) and GnRH receptor in gold fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 112, n. 3, p. 303-311, 1998.
- ZANIBONI FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Uruguay River. In: CAROLSFELD, J. et al. **Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status**. Ottawa: World Fisheries Trust, 2003. p. 161-194.
- ZANIBONI-FILHO E.; WEINGARTNER M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.
- ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J. E. P. Et al. (Ed.). **Tópicos Especiais em Piscicultura de Agua Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 45-73.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 19, n. 2, p. 233-240, 2006.

ZHOU, Q. et al. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. **Biology of Reproduction**, New York, v. 78, n. 3, p. 537– 545, 2008.

ZOHAR, Y. et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 438–455, 2010.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, Maine, v. 197, n. 1-4, p. 99–136, 2001.

6. VITA

Daniel Antonio Rotili, filho de Lucidio Rotili, e Margarida Rotili, nascido em Jaciára/MT, no dia 08 de Setembro de 1985.

Em 2007, ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Federal de Santa Maria, Campus Palmeira das Missões/RS, Durante o curso de graduação, desenvolveu estágio extracurricular, nos setores de Forragem, Bromatologia e Piscicultura, com estágio de conclusão na empresa Bom Futura, setor de Piscicultura, no município de Campo Verde/MT, no ano de 2011, concluindo a graduação em Junho de 2011.

Em 2012, ingressou no curso de Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela Universidade Federal de Santa Maria-Santa Maria/RS, sendo bolsista CAPES. Em Março de 2014, obteve o título de Mestre em Zootecnia/Produção Animal.

Em Abril de 2014, ingressou no curso de Doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, na área de concentração Produção Animal, com bolsa CAPES.

7. APÉNDICE

Author Guidelines

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS (Updated February 2018)

Thank you for your interest in the *Journal of Fish Biology (JFB)*. We look forward to handling your submission.

To allow swift consideration of the work, *JFB* has relaxed some aspects of manuscript formatting until a manuscript is resubmitted following review and provisional acceptance for publication. So, please carefully follow these instructions to avoid unnecessary delay and possible rejection of your paper, especially as some instructions are new. The review process itself remains unchanged.

Contents

- [1. Aims and Scope](#)
- [2. Submission Process](#)
- [3. Preparing Your Submission](#)
- [4. Ethical Considerations](#)
- [5. Editorial Policies and Journal Styles](#)
- [6. Publication Process After Acceptance](#)
- [7. Editorial Office Contact Details](#)

1. AIMS AND SCOPE

The aim of *JFB* is to publish exciting, high quality science that addresses fundamental questions in fish biology. All submissions must be original and not simultaneously submitted to another journal.

We publish four categories of papers:

An Original Research Article: This contains new biological insight into any aspect of fish biology, particularly those that report results and ideas of interest and value for our wide international readership. Hence, the novelty of the content of manuscripts should have relevance beyond a particular species or place in which the work was carried out.

A Brief Research Communication: This covers any subject within the scope of *JFB*, but should be confined to a single topical point or issue of progress, such as an unusual occurrence, an interesting observation, a timely finding or an important technical advance. Again, relevance beyond the species or locality under consideration is needed.

A Review Article: This is a concise, critical and creative article that synthesizes and integrates available knowledge, and that stimulates topical debate and new research. Authors should submit a synopsis (two pages maximum) of their paper to an Associate Editor for consideration.

A Comment to the Editor: A brief comment on a recently published research paper in *JFB* may be submitted for publication to the Editor-in-Chief. If accepted, it will be sent to the original authors to provide an opportunity for a **Reply** that will be published along with the comment. The following topics are usually **not considered** for publication in *JFB*:

- Commercial fishery stock assessment.
- Basic studies on diet, reproduction, aquaculture techniques, new aquaculture species or toxicology for a single species or a narrow geographic area, unless they have broader significance/interest.

- New markers, unless they are accompanied by detailed work focusing on their usage and addressing relevant biological questions (e.g. population structuring, parentage and genetic mapping).

Special Issues of *JFB* are also published. These regular issues usually comprise either submissions on emerging topics that are specially commissioned by the Editorial Team, or key contributions presented at the FSBI Annual Symposium.

2. SUBMISSION PROCESS

A submission to *JFB* implies that the content has not been submitted for publication elsewhere or previously published except as either a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting/symposium, or MSc/PhD thesis.

All categories of manuscripts are submitted online at <http://jfb.edmgr.com>, where a user ID and password are assigned on the first visit. Full instructions and support are available on this site. The manuscript text (with pagination, line numbering and a legible 12 pt font size) is uploaded as a text file (not as a .pdf). Separate files for any Tables (text files) and Figures (ESP files) are uploaded to the website independently. During submission, authors must identify an appropriate subject area ('Select Section/Category section) to assign a handling editor and suggest potential referees ('Suggest Reviewers' section). Suggested reviewers are expected to be established experts in the field and be independent of the research under discussion, including the source of funding and the authors' institutions. We strongly recommend that authors use an ORCID iD (a unique author identifier) to help distinguish your work from that of other researchers (for more details visit: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/submission-peer-review/orcid.html>). If you experience difficulty with your submission, please contact the Managing Editor at: journaloffishbiology@btconnect.com (see Section 7).

3. PREPARING YOUR SUBMISSION

Authors should consult recent issues of *JFB* for examples of content, emphasis and presentation. Authors whose first language is not English are encouraged to have their manuscript carefully checked before submission by an expert in English or a native English speaker. Wiley Editing Services (wileyeditingservices.com/en/) offer expert help in English language editing, translation, manuscript formatting and figure preparation to ensure that a manuscript is ready for submission.

As *JFB* serves an international community of fish biologists, some conventions are required (see Section 5).

3.1 Preparing an Original Research Article

Authors may submit a manuscript using either UK or North American English spelling, with the exception of exact quotations that are placed in quotation marks. Accepted papers will be converted to **UK English** (the standard is the *Concise Oxford English Dictionary*) during the production process. Latin words, e.g., a genus and species, appear in italics. A cover letter is not mandatory.

An **Original Research Article** consists of 12 essential parts:

- Title page
- Abstract
- Significance Statement
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements
- Contributions

References

Tables

Figures

When appropriate, submissions may include Supporting Information.

Title page

The title page must contain the following information:

1. **Title of the paper**, which should be short, informative and avoid any geographical or regional references, unless they are fundamental to the scientific thrust of the paper. If a species name is used in the title, we require a common name (if available) followed by the full scientific name. See Wiley's tips for search engine optimization: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/Prepare/writing-for-seo.html>;
2. The **family (or formal) name** by which each author is known **plus the initials for their given or familiar names** (see Section 6 for criteria on author eligibility);
3. The **address in full of each author's primary affiliation** (university, research institute, etc.) as a numbered list below the Author list;
4. The **corresponding author**, their **telephone number** and their **email address**. Where necessary, a **footnote** can be added stating that certain authors '... made an equal contribution to this work'. An author's current address can be added to a footnote when different from that at the head of the page.

Abstract

The **Abstract** must be a concise and accurate summary of the **significant findings** of the paper without any introductory or contextual information. Methods can be identified only as part of a result (e.g., Respirometry revealed that exercise increased...; GWAS identified a significant number of SNPs...). If a species name is used in the Abstract, we require a common name (whenever available) followed by the full scientific name.

A list of up to 6 descriptive **Key Words** (maximum 100 characters) in alphabetical order follow the Abstract. Specific geographical (e.g., Baffin Island, Amazon Basin) or regional references (e.g., south-east Asia) can be included here.

Significance Statement

The **Significance Statement** (no more than 75 words) will be available for reviewers as part of the peer review process. It should explain the significance and relevance of the findings of the manuscript to a broad readership and will ultimately appear directly below the online title within the online table of contents. Suggested content includes: an introductory sentence and/or why a problem/unanswered question was important to address; what has been shown/what does the manuscript do to fill a gap in our knowledge; what it means to the field as a whole. A Significance Statement may undergo editorial revision.

Introduction

The **Introduction** alerts readers to literature relevant to the research discovery. The originality of the research cannot be easily assigned without a proper description of the relevant literature. Also, the Introduction must state the intent of the research in the form of a research question or hypothesis so that no confusion arises as to what advance in fish biology is being sought. Footnotes to the text are not allowed; any such material should appear in the text as parenthetical matter.

Examples of text citations of references

Text citations of references use the style "author, date" and multiple references are list in chronological order.

For example: ‘...as demonstrated by McKenzie (2001) and by McKenzie & Farrell (2010)’; ‘...as suggested previously in some works (Sloman, 2010), but not others (McKenzie & Farrell, 2010)’; ‘...consistent with earlier studies (Blaber, 1975, 1988; Prodöhl, 1988; Lujan, 2011a,b)’. Three or more authors are cited with the name of the first author followed by *et al.* (in italics): e.g., (Sloman *et al.*, 2002) or Sloman *et al.* (2002). Authors sharing the same surname and year of publication are distinguished by their initials: e.g., (Young, L., 2012; Young, T., 2012).

Materials and Methods

The **Materials and Methods** may contain up to two levels of sub-headings and must provide sufficient detail so that the work can be replicated by others. Established methods can be simply referenced, preferably acknowledging the original work (rather than a recent user of that method), even if minor changes have been made (which should be described). Materials and Methods must also include information on how observations were analysed to derive the quantitative results. Statistics should be based on independent biological samples. Technical replicates should be averaged before statistical treatment and not used to calculate deviation parameters. In the case of multiple comparisons (e.g., microarray data), the probability of false positives should be considered in the analysis.

Results

This section, which may contain up to two levels of sub-headings, presents a concise and accurate description of the results of the research. Figures and Tables, which are numbered consecutively in order of their mention in the text, increase the clarity and conciseness of the result presentation, but should not excessively duplicate material. All statements concerning quantitative differences between experimental conditions require quantitative data and adequate statistical treatment. The deviation parameter, the number of biological samples and the statistical procedures should be provided for each dataset either in the main text or as part of a Figure or Table.

Discussion

The Discussion, which may contain up to two levels of sub-headings, is intended to place the results into the broader context of existing literature so that the significance, quality and novelty of the work can be established. The Discussion should return to and address the original research question or hypothesis, as stated in the Introduction. Excessive repetition of results should be avoided. The potential for future work or a brief perspective on the findings can be included in the Discussion.

Acknowledgements

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed here with their initial only and without titles or honorifics, e.g., A. P. Farrell, not Prof. Tony Farrell. Thanks to editors and anonymous reviewers are not appropriate. All sources of financial and material support for individual authors (identified by their initials) funding in support of the research described must be declared here when submitting the manuscript. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Contributions

The contributions of each author (their initials only, e.g., A. P. F.) must be listed here. Contributions include ideas, data generation, data analysis, manuscript preparation and funding.

References

All published citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list, which includes all key elements of each reference, including the names of journals in full. A manuscript title must appear exactly as in the original

publication. However, manuscript submissions are not required to use JFB reference formatting, which will be corrected during the publication process if the article is accepted. Examples of reference content requirements are shown below.

Journal Article: Lacomme, C. & Santa Cruz, S. (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 7956–7961. doi.org/10.1111 /rego.12074

Online Article Not Yet Published in an Issue: Lacomme, C. & Santa Cruz, S. (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. doi.org/10.1111/rego.12074 An online article is cited by its Digital Object Identifier (DOI), which remains valid and allows article tracking even after its allocation to an issue. It has no volume, issue or page numbers.

Book: Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Chapter in a Book: Shah, J. & Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid: signal perception and transduction. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones* (Hooykaas, P. P. J., Hall, M. A. & Libbenga, K. R., eds), pp. 513–541. New York, NY: Elsevier Science.

Doctoral Thesis: These must have a permanent record of where they are held (e.g. thesis has been lodged at the individual's University or Institution Library as a permanent addition to the collection there), e.g., Lockwood, S. J. (1972). An ecological survey of an 0-group plaice population, Filey Bay, Yorkshire. Ph.D. Thesis. University of East Anglia, Norwich, U.K.

Master's Thesis: These must be readily available electronically and the URL provided, e.g., Cox, G. K. (2010). Anoxic survival and cardiovascular responses of the Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii*. https://open.library.ubc.ca/UBC_cIRcle.

Electronic References: These include references not subject to peer review and formal publication and can be set out as shown given below. ICES (2016). Report of the Baltic salmon and trout assessment working group (WGBAST).

ICES CM 2016/ACOM:09. Available at:

http://ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Expert%20Group%20Report/acom/2016/WGBAST/wgbast_2016.pdf

Marshall, A., Bennett, M. B., Kodja, G., Hinojosa-Alvarez, S., Galvan-Magana, F., Harding, M., Stevens, G. & Kashiwagi, T. (2011). *Manta birostris*. In *IUCN Red List of Threatened Species* Version 2013.2. Available at <http://www.iucnredlist.org/details/198921/0> (last accessed 9 December 2013).

Tables

Tables are submitted as a separate text files (not pasted as images) and without vertical lines. They complement but do not duplicate information contained in the text. Tables are numbered in order of appearance, are self-contained and include **the full scientific name(s) of the species** to which the table relates. The table caption should be concise and descriptive, and understandable without reference to the main text. Statistical measures such as S.D. or S.E. should be identified in the caption. Dimensions for the units should appear in parentheses in the column headings and not in the legend or body of the table. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values.

Figures

Preparing Figures

Figures complement information contained in the text, but without unnecessary duplication. Figures are submitted in digital format and as separate files.

Native file formats are not accepted. They are listed consecutively in order of appearance in the text. Figures that contain data are intended to accurately, clearly and concisely represent the research results, while other figures may better orientate the reader. A wide variety of formats, sizes and resolutions of high quality figures are accepted for initial peer review. Labelling on Figures should be a sans serif font like Helvetica. Multi-panel Figures are identified by lower case letters [(a), (b), etc.].

More information is found at:
https://authorservices.wiley.com/asset/photos/electronic_artwork_guidelines.pdf

Line artwork (vector graphics) should normally be prepared in black and white with shades of grey, unless colour is essential for clarity. Error bars and the method used to derive them must be included in the caption. Line artwork must be saved as Encapsulated PostScript (EPS) file. **Photographs** should illustrate something that cannot adequately be displayed in any other manner. Electron and light microscope photographs must embed a magnification as a **scale bar**. Staining techniques should be described in the caption. Photographs must be saved as bitmap files (half-tones or photographic images) as Tagged Image Format (TIFF) file.

Maps and charts should be contained within a frame and show either a latitude and longitude or a single co-ordinate (N, S, E or W). The JFB standard for geographical names, countries, seas, rivers, etc. is The Times Concise Atlas of the World. London: Times Books.

Figure captions Figure captions are submitted as a separate text file along with the Figures. A Figure caption is a concise and self-contained description of the figure that can be understood without reference to the main text. They begin with a short title for the figure, which **include the full scientific name(s) of the species** to which the illustration relates. Any lines fitted through data points in the figure must be statistically significant and be supported by the mathematical equation and statistical information (*P*-values and *R*² or *R* values). Keys to the symbols, formulae and regression values may be included in the figure itself. Otherwise, symbols and abbreviations appearing in the figure must be explained in the figure caption. The minimum reduction for a figure may be indicated. If material has previously been published, authors must obtain permission from the copyright owner (usually the publisher) to use any figure. Such usage should cite the author in the caption (or text), e.g., ‘Reproduced with permission from Craig (1975). Note: This requirement also applies to the reproduction of a previously published Table or an extended quotation from material.

Supporting Information

Two types are accepted in *JFB*: files containing videos and animations, and long datasets. Supporting Information contains information that is not essential to the article but is a valuable addition by providing greater depth and background. Supporting Information will be reviewed and will appear without typesetting. It is only hosted online and may include datasets, tables, figures, videos, datasets, etc. The availability of Supporting Information is indicated in the main text after the Acknowledgements, headed ‘Supporting Information’. Short captions list the titles of all supporting material. Supporting Information should be supplied as separate files, and not incorporated into the main manuscript text file. Wiley’s FAQs on Supporting Information is found at: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/Prepare/manuscript-preparation-guidelines.html/supporting-information.html>

3.2 Preparing a Brief Research Communication

A Brief Research Communication should be **confined to a single point or issue of progress**, such as an unusual occurrence, an interesting observation, a particularly topical and timely finding or an important technical advance. It must have

relevance beyond the species or locality under consideration. First records should adhere to best practices proposed by Bello *et al.* (2014) and should strive to aggregate and report regional historical records for the same species. (Bello, G., Causse, R., Lipej, L. & Dulcic, J. (2014). A proposed best practice approach to overcome unverified and unverifiable "first records" in ichthyology. *Cybium* 38, 9-14.) *JFB* no longer considers short technical notes describing molecular markers (e.g. microsatellites). A **Brief Research Communication** must be **no more than 5 printed pages** (c. 2500 words of text) and normally include no more than **one (multi-panel) figure and one table**. While it is written in freeform **without any headings**, it must follow the same format as Research Articles with respect to the Title, Authors and Affiliations, Abstract, Key Words, Statement of Significance, Acknowledgements and References (see Section 3.1). The Abstract is **no more than 90 words**.

3.3 Preparing a Review Article

Prospective authors will submit a synopsis (two pages maximum) of their article to an Associate Editor or the Editor-in-Chief. The synopsis should outline why the review is topical, its main points and objectives, and how it will stimulate debate and research. When the proposal has been accepted, the authors will submit a manuscript within a mutually agreed upon time and page limit. Review papers must conform to the *JFB* Instructions for Authors in all respects, except for the heading requirements.

3.4 Preparing a Comment to the Editor

Comments must be no more than c. 750 words of text and deal with single significant finding or point for discussion concerning recent published papers in *JFB* that needs rapid publication. The submission should include a Title page, Main Text and References (maximum four). It contains no Abstract, Key Words, Tables or Figures. After satisfactory peer review, it will be sent to the original corresponding author for a Reply. The reply will take the same form and will be peer reviewed. Publication will end the debate.

4. ETHICAL CONSIDERATIONS

Ethical considerations for the use of animals

The use and treatment of fishes in research is a critical consideration and Ethical and/or Animal Welfare permits/approvals must be listed in the Materials and Methods. Also, contributors must complete a questionnaire when submitting their paper on the Editorial Manager ('Attach files' page; questionnaire located at pdf/jfb/JFBethicsquestionnaire.rtf). Ahead of submission, authors will benefit greatly from reading our Editorials on animal welfare: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0022-1112.2006.01035.x/full> (2006) and <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8649.2010.02900.x/full> (2011).

Publication Ethics

The Fisheries Society of the British Isles (FSBI) considers that scientists should avoid research threatening the conservation status of any species of fish that is already regarded as threatened according to the IUCN Red List of Threatened Species and the associated current Red List Categories and Criteria (<http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria>) or which is listed as such in a Red Data Book appropriate to the country or geographical area concerned. In accordance with this view, papers based on such research will not be accepted, unless the work had clear conservation objectives.

The acceptance criteria for all papers are research quality and originality, and their significance to our readership. Except where otherwise stated, manuscripts are single-blind peer reviewed. All submissions will be considered by the Editorial Board to determine whether they fall within the scope of the journal. Manuscripts deemed by the

Editorial Team to be either an inappropriate subject area for *JFB*, or of inadequate scientific quality, or poor quality of English, will be quickly returned to authors without review. A cover letter will explain the decision. *JFB* is a member of the Committee on Publication Ethics (<https://publicationethics.org/>) and uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors are found at: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/Prepare/publishing-ethics.html>. Wiley's Publication Ethics Guidelines are found at: <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html>.

Submissions that are sent out for full external review of the scientific quality and the contribution to Fish Biology will be assessed typically by at least two experts; however, in extenuating circumstances (e.g., a delay caused by an overdue reviewer), the Handling Editor may make a decision based on the comments of only one reviewer, in addition to their own assessment of the manuscript. Any requested revisions to the manuscript will have a time line and must be completed to the satisfaction of the Handling Editor, who may consult with the original referees.

If a previously rejected manuscript has been invited to be resubmitted, the manuscript will typically be sent to the same reviewers who saw the original version, providing those reviewers are available. However, in some cases, the Handling Editor may decide that it is not appropriate to re-invite one or more of the original reviewers and/or may judge that a fresh reviewer is needed. While there is no time line for such resubmissions, authors must recognize that the impact of their work, and hence its suitability for *JFB*, may be lessened as knowledge advances with time. Wiley's policy on confidentiality of the review process is available at: <https://authorservices.wiley.com/Reviewers/journal-reviewers/how-to-perform-a-peer-review/general-and-ethical-guidelines.html>

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work. Any person listed as an author, by definition, will have contributed substantially to the article's conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data. All listed authors will be contacted by email after a manuscript is submitted to confirm their contribution. Listed authors should meet the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; given final approval of the version to be published and have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content;
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and
3. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript. (<https://www.crossref.org/services/funder-registry/>).

How individual authors specifically contributed to the work is listed in the **Contributions** statement.

Additional authorship options

Joint first and/or senior authorship: In the case of a joint first authorship a footnote should be added to the author listing, e.g., ‘X and Y should be considered joint first author’ and/or ‘X and Y should be considered joint senior author.’

5. EDITORIAL POLICIES AND JOURNAL STYLE

Abbreviations and acronyms: All abbreviations and acronyms must be given in the fully expanded form on first mention in the text and in all figure and table captions except for the small number of abbreviations and acronyms that are scientifically accepted, e.g., DNA. Authors will find the following two publications helpful:

BSI (1967). *Recommendations for Letter Symbols, Signs and Abbreviations*: BS 1991, Part I. London: British Standards Institute.

Baron, D. N. (Ed.) (1977) *Units, Symbols and Abbreviations. A Guide for Biological and Medical Editors and Authors*, 3rd edn. London: The Royal Society of Medicine.

Units: Physical measurements only use metric units in accordance with the Systeme International d’Unites (SI), e.g., m, mm³, s (h and day are acceptable), g, m s⁻¹, g l⁻¹, mg l⁻¹ (not ppm), J (not calories).

The 24-h clock is used for time of day, e.g., 1435 hours, not 2.35 p.m. Calendar dates use day month year, e.g., 15 June 1998.

Salinity has no units; do not use psu, ‰ or similar.

Ship’s speed is given in km h⁻¹; knots (nautical miles h⁻¹) can follow in parentheses.

Latitude and longitude can be given either as degrees minute seconds, or decimal degrees, at a level of precision proportionate to the accuracy of the fix. (0.1 second of latitude is equivalent to 185 m, but this decreases for longitude by the cosine latitude).

Statistics, equations & mathematical expressions: Authors will find the following editorials useful.

Equations and mathematical expressions: *Journal of Fish Biology* **82**, 1771–1772 DOI: 10.1111/jfb.12146 (2013); Reporting statistics: *Journal of Fish Biology* **78**, 697–699 DOI: 10.1111/j.1095-8649.2011.02914.x (2011)

Where decimal values are given, the number of decimal places should be proportional to the accuracy of the work. Thus, means and error (S.D., S.E., 95% C.L., etc.), should be to the same number of decimal places, e.g., 15.1 + 0.2 and not 15.1 + 0.19. In mathematical expressions, single letters (italic) are used for dimensions, qualified by subscripts (roman) as required, e.g., mass (not weight) *M*, wet mass (*M_w*), length *L*, fork length *L_F* (not FL), standard length *L_S*, index *I*, gonadosomatic index *I_G*, hepatosomatic index *I_H*, etc.

Statistics are presented as follows: name of test, test statistic with associated degrees of freedom (d.f.; *N.B.* an *F* distribution has two d.f. values) and probability level (*P*). Although ANOVA and regression are robust, the real *P*-values are likely to be different from the precise values provided by the statistics program, because of violations of the assumptions. If the manuscript clearly states that data conform fully to all the assumptions of the statistical method used, then precise *P*-values can be cited with three decimal places. Otherwise, *P*-values are normally limited to: > 0.05, 0.05, 0.01 and 0.001. Confidence intervals (95% C.I.) can be provided for parameters estimated by ANOVA and regression analysis. Where numerical resampling (e.g. bootstrapping) is used to assess the statistical significance of a given parameter (e.g. *F_{ST}*), in addition to resulting confidence intervals, the number of replicates should be also provided (e.g. 1000 bootstrap replicates).

Species nomenclature, authority and nomenclature: The plural of more than one individual of a single species is ‘fish’, but it is ‘fishes’ if there is more than one species. First use of species names in the Title and Abstract must include common (if available) and scientific names without describing the authority and date of authorship. **First mention of a fish species in the main text must include the common name (if available) the binomial scientific name (in italics) and the describing authority and date of authorship**, e.g., rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792), not (Walbaum, 1792). Naming authorities must appear in full except Linnaeus, 1758 e.g., Atlantic salmon *Salmo salar* L. No commas are necessary to separate either the common name from the species, or the authority from the date. **After this first mention, the species should then ONLY be referred to by its scientific name.** There should then be no further reference to the common name, describing author or date. The genus name can be abbreviated to a single letter (e.g., *C. carpio* and *O. mykiss*), except either at the start of a sentence, or where confusion arises from multiple genera with the same first letter, when genus is given in full or the first three letters of the genus provides a clear distinction.

The use or absence of parentheses around the naming authority’s name and date is covered by strict scientific rules. If the current accepted genus and species name is the same as that given by the original naming author, the name appears without parentheses, e.g., *Pleuronectes platessa* L. 1758, but if the current accepted scientific name differs from that given by the original naming author, the original author’s name appears within parentheses, e.g., *Platichthys flesus* (L. 1758).

Please see for **correct scientific names and formatting of naming author:** Eschmeyer, W. N. (Ed.) *Catalog of Fishes* electronic version (15 November 2013). <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

Please see for **accepted common names of fishes:**

Wheeler, A. (1992). A list of the common and scientific names of fishes of the British Isles. *Journal of Fish Biology* **41**(Suppl. A), 17–26. doi: 10.1111/j.1095-8649.1992.tb05644.

Wheeler, A. C., Merrett, N. R. & Quigley, D. T. G. (2004). Additional records and notes for Wheeler’s (1992) List of the Common and Scientific Names of Fishes of the British Isles. *Journal of Fish Biology* **65**(Suppl. B), 1–40. doi: 10.1111/j.0022-1112.2004.00583.x

Nelson, J. S., Crossman, E. J., Espinosa-Perez, H., Findley, L. T., Gilbert, C. R., Lea, R. N. & Williams, J. D. (2004). Common and scientific names of fishes from the United States, Canada, and Mexico, 6th edn. Special Publication 29. Bethesda, MD: American Fisheries Society.

Froese, R. & Pauly, D. (Eds) (2013). *FishBase*. World Wide Web electronic publication. Available at <http://www.fishbase.org/Search.php>

FAO (2013). *ASFIS List of Species for Fishery Statistics Purposes*. Rome: Fisheries & Aquaculture Department, FAO. Available at <http://www.fao.org/fishery/collection/asfis/en>

Synonyms for a species require the following style: *Eptatretus cirrhatus* (Forster 1801) *Homea banksii* Fleming 1822: 375 (original description; type locality: South Seas; holotype: unknown); *Bdellostoma heptatrema* Muller 1836: 79 (original description; type locality: South seas; holotype: unknown); *Bdellostoma forsteri* Muller 1836: 80 (original description; type locality: Queen Charlotte Sound, New Zealand; holotype: unknown). Conel, 1931: 76 *Bdellostoma forsteri* var. *heptatrema*. Muller, 1838: 174 (new combination); *Bdellostoma cirrhatum*. G^untner, 1870: 511 (in part). Hutton, 1872: 87 (in part). Putnam, 1874: 160 (in part); Gunther, 1880: 27. (Note that species

names that are modifications of an existing binomial, rather than an original description, are separated from the author name by a full stop, *Bdellostoma cirrhatum*. Gunther, 1870: 511 (in part). [based in part on: Mincarone, M. M. & Fernholm, B. (2010). Review of the Australian hagfishes with description of two new species of *Eptatretus* (Myxinidae), *Journal of Fish Biology* **77**, 779–801. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02661.x]

New species: The International Code of Zoological Nomenclature (Article 8.5, amendment) requires that a work bearing a new taxonomic name, issued and distributed electronically must be registered in the Official Register of Zoological Nomenclature (ZooBank) and contain evidence in the work itself of such registration. Any manuscript dealing with the description of new species, genera, or family submitted to JFB must be registered in ZooBank and the name of each new taxonomic name (e.g., new family, genus or species) should be added to ZooBank. Read <http://zoobank.org/> and associated video tutorials (<http://zoobank.org/VideoGuide>) and the Editorial on this subject in *JFB* **90**, 1167–1169.

Curation of taxonomic specimens: Name-bearing type specimens of taxa that are described in the *Journal of Fish Biology* as new to science must be deposited in recognized national or international institutions that can meet ICZN (2012) criteria for Recommendations 72F.1-5 into the foreseeable future: ICZN (2012). *The International Code of Zoological Nomenclature*, 4th edn. London: The International Trust for Zoological Nomenclature 1999.

Other specimens used for taxonomic analyses should, wherever possible, be deposited in appropriate scientific collections (e.g. museums and university collections, or private collections when there is good evidence that these are adequately maintained), with identifying catalogue numbers, so that they are accessible to the scientific community for subsequent examination and taxonomic revision <http://iczn.org/iczn/index.jsp>.

Distribution of paratype series among more than one recognized national or international institution is at the discretion of the authors, but is encouraged for paratype series whenever the paratype series can be split into two or more representative samples for deposit at different institutions. Institutions and their official abbreviations are listed in Eschmeyer's *Catalog of Fishes Online*: <https://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes> and in Poss, S. G. & Collette, B. B. (1995). Second survey of fish collections in the United States and Canada. *Copeia* 1995, 48–70. <http://www.jstor.org/stable/1446799>

Genetic nomenclature: Authors are responsible for ensuring correct style for naming genes, etc. to avoid delay publication at the final proofreading stage. To differentiate genes, proteins etc., by fish origin, JFB uses the zebrafish system: <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>. On first mention, the name of a gene, etc. should be given in full (roman) with its abbreviated form immediately after in parentheses. Thereafter, an abbreviated format should be used, as shown below.

Full name	Abbreviated form
Heat-specific protein-I gene	<i>hspI</i> (all lower case italic)
Heat-specific protein-I	Hsp1 (all roman, capital first letter)
Xxx-x microsatellite locus	Gsp-1 (all roman, capital first letter of genus, followed by: two first initials of species name and the clone number; e.g. Gmo-1 for <i>Gadus morhua</i>)
zzz exon	<i>zzz-ex1</i> (all lower case italic followed by -ex also italics and a number for the exon number)
aaa intron	<i>aaa-in1</i> (cf. exon)
Enhanced fluorescent green protein-N3 plasmid	pEGFP-N3 (all roman capitals preceded by roman lowercase p)
Bbb-x primer	<i>Gsp-1</i> (all italic, capital first letter of genus, followed by: two first initials of species name and the clone number; e.g. <i>Gmo-1</i> for <i>Gadus morhua</i>)
Plasmids	All roman
Mammalian heat-specific protein-I gene	<i>HSP1</i> (all capital italic)
Mammalian heat-specific protein-I	HSP1 (all capital roman)

Sequence data: Descriptions of novel amino-acid sequences of proteins or novel nucleotide sequences (e.g., primer sequences) are only be accepted if they carry a statement that all the data have been deposited with an appropriate data bank, e.g., the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) or GenBank Data Libraries, and the database accession number must be given in the Materials and Methods. Data deposited in genetic data banks should include: specimen catalogue numbers (for specimens preserved in collections); a note identifying sequences that are derived from type specimens; and the collection locality data. For taxonomic papers that refer to sequences derived from specimens preserved in collections, authors should include a Table that clearly links each sequence accession number with the specimen from which it was derived. Sequences from type specimens should be clearly identified by bold text in this table and the significance of the bold text explained as a table footnote. For appropriate nomenclature for genetic sequences for type specimens please see: Chakrabarty, P. (2010). Genotypes: a concept to help integrate molecular phylogenetics and taxonomy. *Zootaxa* **2632**, 67–68. <http://www.mapress.com/zootaxa/2010/f/zt02632p068.pdf>. Sequences from holotypes are identified as hologenotypes, those from topotypes are topogenotypes, and the genetic marker(s) used are incorporated into the nomenclature (e.g. paragenotype ND2). Lengthy nucleotide sequences will only be published in the text if, in the judgement of the Editorial Team, these results are of general interest and importance. Where sequences are already published, reference to the original source will suffice.

RAPD –randomly amplified polymorphic DNA: Papers submitted to *JFB* must not include data generated by RAPD technology because conclusions derived from them may be unreliable.

6. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Author Licensing

If a paper is accepted for publication, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper. Authors may choose to publish under the terms of the journal’s standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License. General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered

under OnlineOpen, please [click here](#). (Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used; to check this please [click here](#))

Self-Archiving Definitions and Policies: Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please [click here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: Authors who choose to publish using OnlineOpen will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please [click here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. After publication of the final version article (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Proofs

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with full instructions on how to provide proof corrections. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

Colour figures

Please provide colour figures only when the colour provides additional clarity. Otherwise figures should be in black and white. Colour figures will be published free of charge.

Early View

The journal offers rapid publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

Access and Sharing

When the article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms &

Conditions of use, they can view the article).

- For non-open access articles, the corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Measuring the Impact of an Article

To find out how to best promote an article, [click here](#). Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

7. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

Managing Editor: Hilary Craig.

Email: journaloffishbiology@btconnect.com

Address: Whiteside, Dunscore, Dumfriesshire, DG2 0UU, UK.